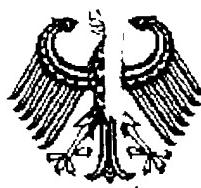


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



j10002 U.S. PRO
09/960428
09/21/01

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 46 960.4
Anmeldetag: 22. September 2000
Anmelder/Inhaber: ROCHE DIAGNOSTICS GMBH,
Mannheim/DE
Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung einer aktiven,
heterodimeren AMV-RT in prokaryotischen Zellen
IPC: C 12 N 15/70

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 02. August 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Verfahren zur Herstellung einer aktiven, heterodimeren AMV-RT in prokaryotischen Zellen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer rekombinanten aktiven heterodimeren AMV-RT durch Expression einer oder mehrerer für die α - und/oder β -Untereinheit(en) der AMV-RT kodierenden DNA-Sequenzen in prokaryotischen Zellen unter bestimmten Wachstums- und Induktionsbedingungen.

Die Entdeckung der Reversen Transkriptasen in den 70er Jahren widerlegte das "zentrale Dogma" der Molekularbiologie über den Informationstransfer von der DNA über RNA zum Protein als unidirektionalen Prozeß (Termin H. und Mizutani S., 1970 Nature 226:1211-1213; Baltimore D., 1970, Nature 226:1209-1211). Die enzymatische Charakterisierung dieser RNA-abhängigen DNA-Polymerasen ist die Basis des derzeitigen Verständnisses über den Vermehrungszyklus von RNA-Viren und somit auch über die Entstehung und Verbreitung von Krankheiten, die durch diese Viren-Gattung verursacht werden (Krebs, AIDS etc.).

Für Molekularbiologen sind diese Reversen Transkriptasen jedoch auch ein Werkzeug zur Synthese, Amplifikation und Klonierung von cDNAs (RT-PCR). Diese Technik erlaubt eine vereinfachte und beschleunigte Untersuchung von Genexpression in eukaryontischen Zellen. Nach Isolierung der gesamten mRNA aus Zellextrakten oder Geweben wird durch die Rverse Transkriptase die mRNA in cDNA "rückübersetzt" und durch den darauffolgenden PCR-Schritt amplifiziert, so daß eine Klonierung und Charakterisierung möglich ist. Dadurch entfällt einerseits die Aufklärung von Intron- und Exon-Strukturen der Gene, andererseits ist auch eine Untersuchung der Genexpression in der Zelle während verschiedener Lebenszyklen oder bei der Entstehung von Krankheiten (wie z.B. Krebs) möglich.

Reverse Transkriptasen (RT) aus drei verschiedenen Retroviren sind bislang genauer untersucht: Die RT aus *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV). Dieses Enzym besteht aus einer einzigen Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 78 kDa (Prasad V.R., 1993 reviewed in *Reverse Transcriptase*, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 135). Ferner ist eine RT aus *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) bekannt. Diese RT ist ein Heterodimer, das sich aus zwei Untereinheiten, p66 und p51, zusammensetzt, wobei die Untereinheit p51

durch proteolytische Spaltung von p66 entsteht (Le Grice S.F.J., 1993 reviewed in *Reverse Transcriptase*, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 163). Darüber hinaus sind RT's aus *Avian Sarcoma-Leukosis Virus* (ASLV) bekannt. Zu der Familie der ASLV gehört auch die aus *Avian Myeloblastosis Virus* (AMV) erhältliche RT. Diese RT ist ebenfalls ein Heterodimer, das sich aus einer α -Kette mit einem Molekulargewicht von ca. 63 kDa und einer β -Kette mit einem Molekulargewicht von ca. 95 kDa zusammensetzt. Auch hier entsteht die α -Kette durch proteolytische Prozessierung der β -Kette (Golomb M. und Grandgenett D., 1979, *J. Biol. Chem.* 254: 1606-1613; Weiss R. et al., eds. 1984, *Molecular biology of tumor viruses*, 2nd edition: *RNA tumor viruses 1/Text*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York).

Während die M-MLV-RT als Monomer und die HIV-RT als Heterodimer in *E. coli* exprimiert werden können, ist die Expression der AMV-RT als aktivem bzw. löslichem Heterodimeren in *E. coli* oder anderen Prokaryonten bislang nicht in zufriedenstellendem Maße möglich. Gemäß WO 00/42199 werden zwar bestimmte RT-Varianten in *E. coli*- bzw. bevorzugt in eukaryotischen Insektenzellen exprimiert, die gewünschte RT wird dabei jedoch mit überwiegend unlöslichem Anteil (ca. 90%) erhalten.

Ferner ist eine rekombinante AMV-RT in Zellrohextrakten von *E. coli* schwer meßbar, da zum einen eingesetzte RNA-Templates durch *E. coli*-eigene RNasen abgebaut werden und zum anderen *E. coli*-Stämme eine DNA-Polymerase besitzen, die neben der DNA-Polymerase-Aktivität auch eine RT-Aktivität aufweist (Ricchetti, M. und Huc, H., 1993, *EMBO J.* 12 (2), 387-396). Diese *E. coli*-eigene RT-Aktivität stört somit die Bestimmung der Aktivität der rekombinanten AMV-RT in *E. coli*-Rohextrakten und in Fraktionen der Reinigung beträchtlich.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, eine rekombinante aktive heterodimere AMV-RT in ausreichenden Mengen zur Verfügung zu stellen.

Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung einer aktiven heterodimeren AMV-RT in prokaryotischen Wirtszellen, wobei eine oder mehrere DNA-Sequenz(en), die für die α - und β -Untereinheit bzw. -Kette der AMV-RT kodieren, in Expressionsplasmide kloniert werden, die Expressionsplasmide in prokaryotischen Zellen transformiert werden, die Expression der heterodimeren AMV-RT induziert wird und die rekombinante heterodimere AMVR-RT aus den Zellen aufgereinigt, d.h. isoliert wird. Geeignete Gene bzw. DNA-Sequenzen sind unter anderem solche, die nur für eine der AMV-RT-Untereinheiten kodieren. Ein Teil des Expressions-

produktes kann anschließend durch bestimmte Maßnahmen, wie z.B. proteolytische Spaltung der β -Kette, in die jeweils andere Untereinheit überführt werden. Als besonders geeignet haben sich für das erfindungsgemäße Verfahren die Sequenzen SEQ ID NO: 4 und SEQ ID NO: 5 erwiesen, welche zu einer aktiven heterodimeren AMV-RT bestehend aus den Untereinheiten SEQ ID NO: 6 und SEQ ID NO: 7 führt.

Die für die Untereinheiten der AMV-RT kodierenden Strukturgene bzw. DNA-Sequenzen können entweder auf unterschiedlichen, von einander getrennten Expressionsplasmiden oder einem Expressionsplasmid kloniert, gegebenenfalls in Gegenwart von sogenannten Helperplasmiden und in einer entsprechenden Wirtszelle exprimiert werden. Geeignete Expressionsplasmide sind beispielsweise pDS, pKK177-3 oder pKKT5. Erfindungsgemäß bevorzugt ist das Plasmid pKKT5, in welchem die jeweiligen Strukturgene unter Kontrolle des T5-Promotors insertiert sind. Weitere mögliche Promotoren, wobei es sich bevorzugt um IPTG induzierbare Promotoren handelt, sind beispielsweise der lac-, lac UV5- oder tac-Promotor. Optional zu verwendende Helperplasmide, wie z.B. das Plasmid pUBS520, und geeignete Selektionsmarker, wie beispielsweise Ampicillin oder Kanamycin, sind dem Fachmann prinzipiell bekannt.

Die Expressionsplasmide sowie gegebenenfalls weitere Helperplasmide werden in eine geeignete prokaryotische Wirtszelle transformiert. Bevorzugt wird erfindungsgemäß ein *E. coli*-Stamm, wie beispielsweise *E. coli* K12 C600, DH5 α , LE392, JM83, JM105, NM522, M15, RR1 Δ 15, UT5600, TG1, A1200 oder die Stämme *E. coli* B, BL21, HB 101 verwendet. Besonders bevorzugt ist erfindungsgemäß der *E. coli*-Stamm LE392.

Die Expression der heterodimeren AMV-RT kann durch verschiedene Maßnahmen induziert werden. Insbesondere positive Auswirkungen auf die Expression von aktiver AMV-RT haben bestimmte Wachstums- und Induktionsbedingungen. Eine Wachstumstemperatur im Bereich von 10° bis 25°C bei einer gleichzeitig erniedrigten Induktorkonzentration hat sich erfindungsgemäß als vorteilhaft erwiesen. Als besonders geeignet hat sich eine Wachstumstemperatur von etwa 15°C und eine Induktorkonzentration zwischen 0,1 und 0,5 mM, bevorzugt von etwa 0,15 mM erwiesen. Bevorzugt wird erfindungsgemäß IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) oder Lactose als Induktor eingesetzt.

Ferner hat sich gezeigt, daß die lösliche Expression der AMV-RT in prokaryotischen Zellen durch die Coexpression von Hilfsgenen gesteigert werden kann. Als mögliche Hilfsgene kommen insbesondere das trpT-Gen, das für die Tryptophan-tRNA kodiert, in Frage. Darüber hinaus sind

Chaperongene zur löslichen Expression geeignet, wie beispielsweise, die für GroEL und GroES, GrpE, ClpB, Dnak und DnaJ kodierenden Gene. Die Gene für ein oder mehrere Chaperone befinden sich dabei bevorzugt auf einem Helferplasmid mit induzierbarem Promotor, die Gene, die für die Chaperone GroEL und GroES kodieren, befinden sich unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors auf dem Expressionsplasmid, auf dem sich auch die Strukturgene für die α - und/oder β -Kette befinden. Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist jedoch, wenn die für GroEL und GroES kodierenden Gene auf dem Expressionsplasmid, das die Gene für die α - und β -Kette trägt, kloniert sind und die für Dnak, DnaJ, GrpE und ClpB kodierenden Gene auf einem Helferplasmid kloniert sind.

Zur Aufreinigung bzw. Isolierung der rekombinanten heterodimeren AMV-RT aus dem Zellextrakt werden – neben den dem Fachmann allgemein bekannten Maßnahmen – insbesondere geeignete Affinitätschromatographiematerialien wie metallionen-chelatisierende Materialien oder Kationenaustauscher verwendet. Besonders vorteilhaft für die Reinigung der AMV-RT ist, wenn die Expressionsprodukte, d.h. sowohl α - und β -Kette mit solchen Peptidsequenzen fusioniert sind, die zur reversiblen Bindung an bestimmte Säulenmaterialien, wie z.B. Kationenaustauscher, metallionenchelatisierende Materialien, wie Nickel-, Kupfer- oder Zink-Nitriloessigsäure-(NTA-) Harze, geeignet sind. Erfindungsgemäß geeignete Peptidsequenzen können von zwei bis etwa 100 Aminosäuren bzw. Aminosäurederivate aufweisen. Peptidsequenzen, die aus zwei bis zehn Aminosäuren, z.B. Argininresten oder Histidinresten bestehen, haben sich erfundungsgemäß als besonders geeignet erwiesen. Ferner hat sich als besonders geeignet erwiesen, wenn solche Peptidsequenzen, die aus acht Arginin- bzw. aus sechs Histidinresten bestehen, verwendet werden. Darüber hinaus sind auch kommerziell erhältliche Peptidsequenzen wie z.B. Strep-tag® (IBA GmbH, Göttingen/Deutschland) oder das GST-tag (Pharmacia, Uppsala/Schweden) für das erfundungsgemäße Verfahren geeignet.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter:

1. Beispiel:

Isolierung der Gene, die für α -Kette und β -Kette kodieren

Zur Isolierung der β -Kette wurden nach der Datenbank-Sequenz (MEDLINE ID 94366722, Baluda *et al.*, 1994) Oligonukleotide als Primer designed (s. SEQ ID NO: 1 und 2). Am 5'-Ende wurde eine EcoRI-Restriktionsendonukleaseschnittstelle und am 3'-Ende eine PstI-Restriktions-

endonukleaseschnittstelle für die spätere Klonierung in Vektoren eingebaut. Zusätzlich wurde ein weiterer 3'-primer designed (s. SEQ ID NO: 3), der die Isolierung der α -Kette ermöglicht. Beide Ketten wurden sowohl aus Virus-Lysat (ATCC VR-265) mittels RT-PCR wie auch aus einem *E. coli*-Klon (ATCC 31990), der die β -Kette auf einem Plasmid trägt, mittels PCR gefischt. Die PCR-Ansätze wurden auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen, die PCR-Fragmente von ca. 1715 Bp für die α -Kette und ca. 2570 Bp für die β -Kette wurden aus dem Agarosegel isoliert (QIAEX II, Gel Extraction Kit, Qiagen/Deutschland), mit den o.a. Restriktionsendonukleasen nachgeschnitten und in ein ebenfalls mit *Eco*RI und *Pst*I linearisiertes und isoliertes Vektorfragment von pUC19 kloniert. Dazu wurden jeweils 1 μ l (20 ng) Vektorfragment und 3 μ l (100 ng) PCR-Fragment, 1 μ l 10x Ligase-Puffer (Maniatis *et al.*, 1989 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press NY (USA), B.27), 1 μ l T4 DNA-Ligase, 4 μ l steriles H₂O_{bdest.} pipettiert, vorsichtig gemischt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Die klonierten Gene wurde anschließend mittels Restriktionsanalyse und durch Sequenzierung untersucht. Die Sequenzen sind in SEQ ID NO: 4 (α -Kette) und SEQ ID NO: 5 (β -Kette) dargestellt.

Ein Vergleich mit der Datenbanksequenz (MEDLINE ID 94366722, Baluda, M.A., und Reddy, E.P., 1994, Oncogene 9:2761-2774) ergab für die α -Kette und für die β -Kette jeweils eine Homologie von 98,8 % auf DNA-Ebene. Wenn die daraus resultierenden Aminosäuresequenzen miteinander verglichen werden, so wird deutlich, daß die meisten Austausche auf DNA-Ebene sogenannte stumme Mutationen sind, d.h. zu keinem Aminosäureaustausch führen. Lediglich drei Basenaustausche führen auch zu Aminosäureaustauschen, sind aber reproduzierbar in jedem isolierten PCR-Produkt zu finden. Es handelt sich dabei um die Austausche Arg273Met, Arg304Gln und Asp495Glu. Die Aminosäuresequenzen beider Ketten sind in SEQ ID NO: 6 (α -Kette) und SEQ ID NO: 7 (β -Kette) dargestellt.

2. Beispiel:

Expression von α -Kette und β -Kette ohne fusionierte Peptidsequenzen (tags)

2.1. Konstruktion der Expressionsplasmide pAMV- α und pAMV- β

Zur Expression der AMV-RT wurden die Gene für beide Ketten getrennt in Expressionsvektoren so kloniert, daß die Strukturgene jeweils in der richtigen Orientierung unter Kontrolle des T5-

Promotors insertiert sind. Dazu wurde das jeweilige Strukturen für die α - bzw. die β -Kette mittels *Eco*RI und *Pst*I aus dem Plasmid pUC19 ausgeschnitten, die Restriktionsansätze durch Agarosegelektrophorese aufgetrennt und das 1715 Bp große Fragment der α -Kette bzw. das 2570 Bp große Fragment der β -Kette aus dem Agarosegel isoliert. Zur Expression wurde das Expressionsplasmid pKKT5, welches aus pKK177-3 (Kopetzki *et al.*, 1989, *Mol. Gen. Genet.* 216: 149-155) durch Austausch des *tac*-Promotors durch den T5-Promotor aus pDS (Bujard *et al.*, 1987, *Methods Enzymol.* 155: 416-433) entstanden ist, eingesetzt. Die *Eco*RI-Restriktionsendonuklease-schnittstelle in der Sequenz des T5-Promotors wurde durch zwei Punktmutationen entfernt. Das so entstandene Expressionsplasmid wurde für die Insertion der Gene für die AMV-RT mit *Eco*RI und *Pst*I geschnitten, der Restriktionsansatz durch Agarosegelektrophorese aufgetrennt und das resultierende Vektorfragment von ca. 2500 Bp aus dem Agarosegel isoliert. Das so gewonnene Vektorfragment wurde wie beschrieben getrennt mit den in Beispiel 1 beschriebenen Genen für die α - und die β -Kette ligiert. Die ordnungsgemäße Insertion der Gene wurde mittels Restriktionskontrolle und Sequenzierung überprüft. Die so entstandenen Plasmide pAMV- α und pAMV- β wurden zunächst getrennt zur Expressionskontrolle in verschiedene *E. coli*-Stämme zusammen mit dem Helferplasmid pUBS520 cotransformiert. Denkbar ist hier die Expression von α -Kette bzw. β -Kette getrennt voneinander zur Gewinnung von $\alpha\alpha$ - bzw. $\beta\beta$ -Homodimeren. Das Helferplasmid pUBS520 (Brinkmann *et al.*, 1989, *Gene* 85: 109-114) trägt u.a. das *lacI^q*-Gen, das für den Lac-Repressor kodiert und das *dnaY*-Gen, das für die in *E. coli* seltene tRNA^{Arg} - erkennt die Codons AGA und AGG - kodiert (Garcia *et al.*, 1986, *Cell* 45: 453-459). Als Selektionsmarker wird das Kanamycin-Resistenzgen aus dem Transposon TN903 verwendet.

2.2. Transformation der Expressionsplasmide pAMV- α bzw. pAMV- β getrennt in *E. coli*

Kompetente Zellen verschiedener *E. coli*-Stämme wurden entsprechend der Methode nach Hanahan (*J. Mol. Biol.* 1983, Vol. 166, 557) hergestellt. 200 μ l derart hergestellter *E. coli* LE392-Zellen wurden mit 20 ng isolierter Expressionsplasmid-DNA pAMV- α bzw. pAMV- β und 40 ng Helferplasmid-DNA versetzt. Nach 30 min. Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock (90 sec bei 42°C). Anschließend wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium überführt und zur phänotypischen Expression 1 Stunde bei 37°C in LB-Medium inkubiert. Aliquote dieses Transformationsansatzes wurden auf LB-Platten mit Ampicillin und Kanamycin als Selektionsmarker ausplattiert und 15 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.3. Expression des Gens der α -Kette in *E. coli*

Zur Expression des Gens, das für die α -Kette der AMV-RT kodiert, wurden plasmidhaltige Klone in 3 ml LBampkan-Medium angeimpft und bei 30°C im Schüttler inkubiert. Bei einer optischen Dichte von 0,5 (gemessen bei 550 nm, OD₅₅₀) wurden die Zellen mit 0,5 mM IPTG induziert und 4 h bei 30°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte der einzelnen Expressionsklone bestimmt, ein Aliquot, das einer OD_{550nm} von 5,0/ml entspricht, entnommen und die Zellen abzentrifugiert (10 min, 6000 rpm, 4°C). Das Zellpellet wurde in 400 µl TE-Puffer (50 mM TRIS/50 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert, die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen und durch Zentrifugation die lösliche Proteinfraktion von der unlöslichen Proteinfraktion getrennt (10 min, 14000 rpm, 4°C). Alle Fraktionen wurden mit SDS- und β -Mercaptoethanol-haltigen Auftragspuffer versetzt und die Proteine durch Kochen (5 min 100°C) denaturiert. Anschließend wurden je 10 µl mittels eines analytischen SDS-Gels (10 %) analysiert (Laemmli U.K., 1970, *Nature* 227:555-557).

Nach Auswertung des SDS-Gels ist eine klare Überexpression der α -Kette erkennbar. Bei ca. 63 kDa ist eine stark überexprimierte, zusätzliche Bande zu erkennen, die bei den nicht induzierten bzw. induzierten, aber nicht plasmidhaltigen Kontroll-Klonen nicht beobachtet wird. Ein geringer Anteil der überexprimierten α -Kette erscheint in der löslichen Proteinfraktion, während der größte Anteil als unlöslich exprimierte Protein anfällt.

2.4. Expression des Gens der β -Kette in *E. coli*

Zur Expression des Gens, das für die β -Kette der AMV-RT kodiert, wurden plasmidhaltige Klone in 3 ml LBampkan-Medium angeimpft und bei 30°C im Schüttler inkubiert. Bei einer OD_{550nm} von 0,5 wurden die Zellen mit 0,5 mM IPTG induziert und 4 h bei 30°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte der einzelnen Expressionsklone, bestimmt, ein Aliquot, das einer OD_{550nm} von 5,0/ml entspricht, entnommen und die Zellen abzentrifugiert (10 min, 6000 rpm, 4°C). Das Zellpellet wurde in 400 µl TE-Puffer (50 mM TRIS/50 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert, die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen und durch Zentrifugation die lösliche Proteinfraktion von der unlöslichen Proteinfraktion getrennt (10 min, 14000 rpm, 4°C). Alle Fraktionen wurden mit SDS- und β -Mercaptoethanol-haltigen Auftragspuffer versetzt und die Proteine durch Kochen (5 min 100°C) denaturiert. Anschließend wurden je 10 µl mittels eines analytischen SDS-Gels (8 %) analysiert (Laemmli U.K., 1970, *Nature* 227:555-557).

Nach Auswertung des SDS-Gels ist eine klare Überexpression der β -Kette erkennbar. Bei ca. 95 kDa ist eine stark überexprimierte, zusätzliche Bande zu erkennen, die bei den nicht induzierten bzw. induzierten, aber nicht plasmidhaltigen Kontroll-Klonen nicht beobachtet wird. Der größte Anteil der überexprimierten β -Kette erscheint in der unlöslichen Proteinfraktion, jedoch ist auch eine geringe Überexpression in der löslichen Proteinfraktion zu erkennen.

2.5. Expression beider Ketten auf getrennten Plasmiden in einer Zelle

Zur Expression beider Ketten in einer Zelle mußten zunächst die *lacI^q*-Expressionskassette und die *dnaY*-Expressionskassette aus dem Helferplasmid pUBS520 auf die Expressionsplasmide umkloniert werden. Dabei wurde die *lacI^q*-Expressionskassette auf pAMV- α und die *dnaY*-Expressionskassette auf das Expressionsplasmid pAMV- β kloniert. Um eine stabile Vermehrung der Expressionsplasmide zu gewährleisten, wurde das Ampicillin-Resistenzgen aus pAMV- α durch das Kanamycin-Resistenzgen aus pUBS520 ersetzt. Die so entstandenen Expressionsplasmide pAMV- α_{lacIq} und pAMV- β_{dnay} wurden anschließend in verschiedene *E. coli*-Expressionsstämme cotransformiert.

Zur Expression der Gene, die für die α -Kette und die β -Kette der AMV-RT codieren, wurden plasmidhaltige Klone in 3 ml LBampkan-Medium angeimpft und bei 30°C im Schüttler inkubiert. Bei einer OD_{550nm} von 0,5 wurden die Zellen mit 0,5 mM IPTG induziert und 4 h bei 30°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte der einzelnen Expressionsklone bestimmt, ein Aliquot, das einer OD_{550nm} von 5,0/ml entspricht, entnommen und die Zellen abzentrifugiert (10 min 6000 rpm, 4°C). Das Zellpellet wurde in 400 µL TE-Puffer (50 mM TRIS/50 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert, die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen und durch Zentrifugation die lösliche Proteinfraktion von der unlöslichen Proteinfraktion getrennt (10 min, 14000 rpm, 4°C). Alle Fraktionen wurden mit SDS- und β -Mercaptoethanol-haltigen Auftragspuffer versetzt und die Proteine durch Kochen (5 min 100°C) denaturiert. Anschließend wurden je 10 µl mittels eines analytischen SDS-Gels (8 %) analysiert (Laemmli U.K., 1970, *Nature* 227:555-557).

Nach Auswertung des SDS-Gels ist überraschenderweise eine klare Überexpression der α - und der β -Kette erkennbar. Bei ca. 63 kDa und ca. 95 kDa sind stark überexprimierte, zusätzliche Banden zu erkennen, die bei den nicht induzierten bzw. induzierten, aber nicht plasmidhaltigen Kontroll-Klonen nicht zu erkennen sind. Die Verteilung der Banden in der löslichen bzw. der

unlöslichen Fraktion ist analog wie bei den Expressionsversuchen der beiden Ketten getrennt voneinander. Insgesamt ist die Expressionsleistung für beide Ketten etwas geringer als bei der getrennten Expression.

3. Beispiel:

Expression von α -Kette und β -Kette mit fusionierten tags zur vereinfachten Aufreinigung

3.1. Herstellung verschiedener Fusionsproteine

Zur effizienten Reinigung der rekombinanten AMV-RT-Heterodimere wurden beide Ketten am 5'-Ende mit geeigneten Peptidsequenzen, sogenannten tags fusioniert. Die Verwendung von tags ermöglicht dabei die Durchführung von Affinitätschromatographien. Eine Abfolge von zwei Affinitätschromatographien, die jeweils auf eines der beiden tags gerichtet sind, erlaubt darüber hinaus die Isolierung von reinen Heterodimeren (Wende W. et al., 1996, *Biol. Chem.* 377, 625 – 632). Über entsprechend entworfene primer wurden an die für die α -Kette acht Argininreste und an die β -Kette sechs Histidinreste mittels PCR-Reaktion angehängt. Die Sequenzen der sense-primer sind in SEQ ID NO: 8 (5'- primer für die α -Kette) und SEQ ID NO: 9 (5'-primer für die β -Kette) dargestellt. Als antisense-primer wurden die bereits zur Gen-Isolierung verwendeten Oligonukleotide SEQ ID NO: 2 (β -Kette) und SEQ ID NO: 3 (α -Kette) eingesetzt.

Die PCR-Ansätze wurden auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen, die PCR-Fragmente von 1739 Bp für die α -Kette und 2597 Bp für die β -Kette wurden aus dem Agarosegel isoliert (QIAEX II, Gel Extraction Kit, Qiagen, Germany), mit den Restriktionsendonukleasen *Eco*RI und *Pst*I nachgeschnitten und in ein ebenfalls mit *Eco*RI und *Pst*I linearisiertes und isoliertes Vektorfragment des bevorzugten Expressionsplasmides kloniert. Dazu wurden jeweils 1 μ l (20 ng) Vektorfragment und 3 μ l (100 ng) PCR-Fragment, 1 μ l 10x Ligase-Puffer (Maniatis et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press NY (USA), B.27), 1 μ l T4 DNA-Ligase, 4 μ l steriles H_2O_{bidest} . pipettiert, vorsichtig gemischt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Die klonierten Gene wurde anschließend mittels Restriktionsanalyse und durch Sequenzierung untersucht. Die so entstandenen Expressionsplasmide wurden pAMV- $\alpha lacIq$ -Arg und pAMV- $\beta dnaY$ -His genannt.

3.2. Transformation der Expressionsplasmide pAMV- $\alpha lacIq$ -Arg und pAMV- $\beta dnaY$ -His in verschiedenen *E. coli*-Expressionsstammen

Kompetente Zellen verschiedener *E. coli*-Stämme wurden entsprechend der Methode nach Hanahan (*J. Mol. Biol.* 1983 , Vol. 166 pp. 557) hergestellt (s. Beispiel 2.2).

3.3. Expression beider Ketten mit fusionierten tags auf getrennten Plasmiden in einer Zelle

Zur Expression beider Ketten mit tags in einer Zelle wurden verschiedene *E. coli*-Expressionsstämme mit den Expressionsplasmiden pAMV- $\alpha lacIq$ -Arg und pAMV- $\beta dnaY$ -His cotransfriert.

Zur Expression der Gene, die für die α -Kette mit Arg-tag und die β -Kette mit His-tag der AMV-RT codieren, wurden plasmidhaltige Klone in 3 ml LBampkan-Medium angeimpft und bei 30°C im Schüttler inkubiert. Bei einer OD550nm von 0,5 wurden die Zellen mit 0,5 mM IPTG induziert und 4 h bei 30°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte der einzelnen Expressionsklone bestimmt, ein Aliquot, das einer OD550 von 5/ml entspricht, entnommen und die Zellen abzentrifugiert (10 min, 6000 rpm, 4°C). Das Zellpellet wurde in 400 µl TE-Puffer (50 mM TRIS/50 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert, die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen und durch Zentrifugation die lösliche Proteinfraktion von der unlöslichen Proteinfraktion getrennt (10 min, 14000 rpm, 4°C). Alle Fraktionen wurden mit SDS- und β -Mercaptoethanol-haltigen Auftragspuffer versetzt und die Proteine durch Kochen (5 min 100°C) denaturiert. Anschließend wurden je 10 µl über ein 8 % analytisches SDS-Gel analysiert (Laemmli U.K., 1970, *Nature* 227:555-557).

Nach Auswertung des SDS-Gels ist überraschenderweise eine klare Überexpression der α - und der β -Kette erkennbar. Bei ca. 63 kDa und ca. 95 kDa sind stark überexprimierte, zusätzliche Banden zu erkennen, die bei den nicht induzierten bzw. induzierten, aber nicht plasmidhaltigen Kontroll-Klonen nicht auftauchen. Die Verteilung der Banden in der löslichen bzw. der unlöslichen Fraktion ist analog wie bei den Expressionsversuchen mit beiden Ketten ohne tags in einer Zelle.

3.4. Expression der beiden Ketten mit fusionierten tags auf einem Plasmid

Die Verteilung der „Gene“ für die α - und β -Kette der AMV-RT auf zwei Plasmide könnte auf Grund von unterschiedlichen Stabilitäten dieser Plasmide zur Produktion von unterschiedlichen Mengen der jeweiligen Ketten und somit zur einer geringeren Ausbeute an $\alpha\beta$ -Ketten Heterodimer führen. Daher wurde mit Ausnahme des Gens für die β -Lactamase die gesamte genetische Information der beiden Plasmide pAMV- $\alpha lacIq$ -Arg und pAMV- $\beta dnaY$ -His auf einem einzigen Plasmid, pAMV $\alpha\beta$ -1 vereinigt. Die Konstruktion dieses Plasmides erfolgte durch Insertion des *SspI-AfIII*-Fragmentes von pAMV- $\beta dnaY$ -His, enthaltend die Sequenz für den T5-Promotor, das Gen kodierend für die β -Kette mit N-terminalen His-tag, die Sequenz für den *rrnB*-Terminator und das *dnaY*-Gen, in die *Sal I*-Schnittstelle von pAMV- $\alpha lacIq$ -Arg, enthaltend die Sequenz für den T5-Promotor, das Gen kodierend für die α -Kette mit N-terminalen Arg-tag, die Sequenz für den *rrnB*-Terminator, das Kanamycin-Resistenzgen und das *lacI^R*-Gen. Zu diesem Zweck wurden je 1 μ g der Expressionsplasmide pAMV- $\alpha lacIq$ -Arg und pAMV- $\beta dnaY$ -His mit den oben beschriebenen Restriktionsendonukleasen nach Herstellerangaben geschnitten, die Restriktionsansätze in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und das 4124 Bp große *SspI-AfIII*-Fragment von pAMV- $\beta dnaY$ -His und das 6024 Bp große Fragment von pAMV- $\alpha lacIq$ -Arg aus dem Agarosegel isoliert (QIAEX II, Gel Extraction Kit, Qiagen/Deutschland). Die nicht kompatiblen Enden wurden mit Klenow-Polymerase (Roche Diagnostics GmbH) nach Herstellerangaben aufbereitet und die beiden Fragmente wie oben beschrieben miteinander ligiert. Das neu entstandene Expressionsplasmid pAMV $\alpha\beta$ -1 wurde mittels Restriktionsanalyse untersucht.

Das nach Restriktionsanalyse korrekte Expressionsplasmid wurde wie oben beschrieben in den *E. coli*-K12-Stamm LE 392 transformiert und einer Expressionskontrolle unterzogen. Der Protein gehalt der Zellen nach 4 Stunden Wachstum unter induzierten Bedingungen wurde anschließend mittels SDS-PAGE untersucht. Nach SDS-PAGE-Analyse ist die Höhe der Expressionsleistung und die Verteilung in löslicher und unlöslicher Fraktion vergleichbar mit der Expression der Gene für α - und β -Kette auf getrennten Plasmiden, jedoch erscheint die Menge an exprimierter α - und β -Kette homogener.

Des weiteren wurde für die Reinigungsprozedur der Arg-tag der α -Kette analog zur β -Kette gegen einen His-tag ausgetauscht. Zu diesem Zweck wurde ein Zwischenkonstrukt, pAMV- $\alpha lacIq$ -His, erstellt, indem das *EcoRI-NheI*-Fragment aus pAMV- $\alpha lacIq$ -Arg gegen das *EcoRI-NheI*-Fragment

aus pAMV- β_{dnAY} -His ausgetauscht wurde. Anschließend wurde analog zur Konstruktion von pAMV $\alpha\beta$ -1 mit Ausnahme des Gens für die β -Lactamase die gesamte genetische Information der beiden Plasmide pAMV- $\alpha lacIq$ -His und pAMV- β_{dnAY} -His auf einem einzigen Plasmid, pAMV $\alpha\beta$ -2 vereinigt. Der neu entstandene Expressionsvektor wurde pAMV $\alpha\beta$ -2 genannt. Zellen wurden wie oben beschrieben mit pAMV $\alpha\beta$ -2 transformiert und einer Expressionskontrolle nach Standardbedingungen unterzogen. Die Expressionsleistung war unter diesen Bedingungen nicht erhöht.

4. Beispiel: Expressionsoptimierung

4.1. Erhöhung der Expression an aktiver AMV-RT durch Veränderung der Expressionsbedingungen

Insbesondere positive Auswirkungen auf die Expression von aktiver AMV-RT haben besondere Wachstums- und Induktionsbedingungen. Danach wurde die Wachstumstemperatur während der Induktionsphase von 30°C auf 15°C gesenkt, die IPTG-Konzentration zur Induktion der Expression von 0,5 mM auf 0,15 mM erniedrigt und die Induktionszeit von 4 h auf 26 h erhöht. Der Proteingehalt der Zellen nach der Induktionsphase wurden wie oben beschrieben durch SDS-Polyacrylamidgelektrophorese untersucht.

Danach ist in der SDS-PAGE-Analyse wie erwartet die Gesamtexpressionsleistung von α - und β -Kette stark erniedrigt, der Gehalt an löslich exprimierter α - und β -Kette ist jedoch im Vergleich zu den Expressionsversuchen unter Standardwachstums- und Induktionsbedingungen deutlich erhöht. Diese Erhöhung der Expression von aktiver AMV-RT wurde auch bei der anschließenden Aufreinigung und Aktivitätsbestimmung bestätigt.

4.2. Erhöhung der Expression an aktiver AMV-RT durch Coexpression von Hilfsgenen

4.2.1. Coexpression des Gens für die Tryptophan-tRNA ($tRNA^{trp}$)

Eine Eigenschaft der AMV-RT besteht darin, nach der Infektion einer eukaryontischen Wirtszelle eine zelleigene tRNA für Tryptophan ($tRNA^{trp}$) als "primer" für die Polymerasereaktion zu

verwenden (Leis *et al.*, 1993, in: Reverse Transcriptase, Cold Spring Harbor Monograph Series, eds.: Skala, A.M. and Goff, S.P., Cold Spring Harbor NY (USA), 33-48). Ob die *E. coli* eigene tRNA^{trp} von der AMV-RT als "primer" verwendet werden kann, ist allerdings nicht nachgewiesen. In *E. coli* wird die tRNA^{trp} nur von einem einzigen Gen kodiert, *trpT*, dessen Expression an die normalen Bedürfnisse der Zelle angepaßt ist. Um eine eventuelle Verarmung der Zelle an tRNA^{trp} auszuschließen, wurde das *trpT*-Gen gemäß SEQ ID NO: 10 mittels PCR aus *E. coli* LE392 isoliert (die dafür verwendeten Primer sind in SEQ ID NO:: 11 und 12 dargestellt), für die Insertion in pAMVα_{lacIq}-His mit *PstI* nachgeschnitten und mit dem ebenfalls mit *PstI* linearisierten Vektorfragment von pAMVα_{lacIq}-His wie oben beschrieben ligiert. Klone, die das *trpT*-Gen an der *PstI*-Restriktionsendonukleaseschnittstelle integriert haben, wurden mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft. In diesem Zwischenkonstrukt pAMVα_{lacIq}-His-*trpT* bilden das Gen für die α-Kette und das Gen für die *E. coli* tRNA^{trp} eine Transkriptionseinheit, deren Expression durch den IPTG induzierbaren T5-Promotor reguliert wird. Anschließend wurde analog zur Konstruktion von pAMVαβ-1 bzw. pAMVαβ-2 mit Ausnahme des Gens für die β-Lactamase die gesamte genetische Information der beiden Plasmide pAMV-α_{lacIq}-His-*trpT* und pAMV-β_{dnaY}-His auf einem einzigen Plasmid, pAMVαβ-3 vereinigt. Zellen wurden wie oben beschrieben mit pAMVαβ-3 transformiert und einer Expressionskontrolle nach den modifizierten Expressionsbedingungen unterzogen. Danach ist die Ausbeute an aktiver AMV-RT signifikant erhöht.

4.2.2. Coexpression von Chaperongenen

In *E. coli* gibt es mit der GroESL Maschinerie und einem 4-Komponentensystem, bestehend aus DnaK, DnaJ, GrpE und ClpB, zwei Hauptchaperonsysteme (Kedzierska, 1999). Beide sind sowohl an der korrekten Faltung neu entstehender Proteine, als auch an der Renaturierung streßbedingt aggregierter Proteine entscheidend beteiligt (Hartl F.U., 1996, Nature 381, 571-580; Bukau H. und Horwich A.L., 1998, Cell 92, 351-366; Mogk A. *et al.*, 1999, EMBO J. 18, 6934-6949; Zolkiewski M., 1999, J. Biol. Chem. 274, 28083-28086; Goloubinoff P. *et al.*, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 13732-13737).

In einem ersten Schritt sollte in den AMV-RT Produktionsstämmen das *groESL*-Operon aus *E. coli* überexprimiert werden. Dazu wurde das *EcoRI-HindIII*-Fragment aus pOF39 (Fayet O., Louarn J.-M., Georgopoulos C., 1986, Mol. Gen. Genet. Vol 202, pp. 335-345 in die *SspI*-Schnittstelle des Plasmids pAMVβ_{dnaY}-His integriert. Die nicht kompatiblen Enden wurden vor Ligation

mit Klenow-Polymerase (Roche Diagnostics) nach Herstellerangaben aufbereitet. Die Sequenz von *groESL* ist in SEQ ID NO: 13 dargestellt. In diesem neuen Konstrukt, pAMV $\beta_{\text{DNA}Y\text{-His-groESL}}$, bildet das *groESL*-Operon eine künstliche Transkriptionseinheit mit dem 3` gelegenen Gen für die β -Lactamase. Die Expression erfolgt entweder in Abhängigkeit vom jetzt 5` des *groESL*-Operon positionierten, *bla* eigenen, konstitutiven Promotor und/oder in Abhängigkeit des σ^{32} abhängigen Promotors des *groESL*-Operons. Wie oben beschrieben wurde anschließend wiederum mit Ausnahme des Gens für die β -Lactamase die gesamte genetische Information der beiden Expressionsplasmide pAMV $\alpha_{lacIq\text{-His-trpT}}$ und pAMV $\beta_{\text{DNA}Y\text{-His-groESL}}$ auf einem einzigen Plasmid, pAMV $\alpha\beta$ -4, vereinigt.



Zellen wurden wie oben beschrieben mit pAMV $\alpha\beta$ -4 transformiert und einer Expressionskontrolle nach den modifizierten Expressionsbedingungen unterzogen. Die Coüberproduktion von GroESL bewirkte eine Steigerung der Biomasse und der Menge an aktiver AMV-RT. Im Vergleich zu den bisher besten Produktionsstämmen wurden nach Aufreinigung und Aktivitätstest drei bis viermal höhere Werte erzielt.



Nachdem sich die Coüberproduktion von GroESL in den AMV-RT Produktionsstämmen als positive Maßnahme erwiesen hatte, wurde in einem zweiten Schritt zusätzlich das andere Hauptchaperonsystem von *E. coli* coüberproduziert. Neben den mutmaßlich allgemeinen Vorteilen dieser Coüberproduktion, könnte damit ein Nachteil der GroESL Maschinerie, ihr Ausschlußvolumen von circa 65 kDa (Deuerling E. et al., 1999, Nature 400, 693-696), ausgeglichen werden. Dies dürfte vor allem bei der korrekten Faltung der β -Kette der AMV-RT (93 kDa) bedeutend sein, sofern sich diese nicht in einzelne, unabhängig voneinander bildende Domänen, unterteilen lässt. Entsprechend des physiologischen Zusammenspiels (Diamant S. und Goloubinoff P., 1998, Biochemistry 37, 9688-9694; Pierpaoli E.V. et al., 1998, J. Biol. Chem. 273, 6643-6649) wurden die Gene für DnaK, DnaJ und GrpE in einem künstlichen Operon zusammengefaßt, während das Gen für ClpB eine eigene Transkriptionseinheit bildet. Für die koordinierte Expression mit den "Genen" für die Untereinheiten der AMV-RT wurden beide Transkriptionseinheiten unter die Kontrolle von IPTG induzierbaren T5-Promotoren gestellt.

Klonierungstechnische Gründe erforderten eine Reihe von Zwischenschritten auf dem Weg zum Endkonstrukt pCHAP-5. So wurden zunächst die pKKT5 Derivate pCHAP-1 und -2 konstruiert. pCHAP-1 enthält die genetische Information für das *dnaKJ* Operon aus *E. coli*, vom Startcodon für *dnaK* bis zum Stopcodon für *dnaJ*, pCHAP-2 trägt als Insert die künstliche Transkriptions-

einheit aus den kodierenden Bereichen der Gene für GrpE und ClpB; die entsprechenden DNA-Fragmente wurden über PCR aus genomischer DNA von *E. coli* K12 LE392 amplifiziert. Die Sequenz des *dnaKJ*-Operons ist in SEQ ID NO: 14, die entsprechenden Primer zur Isolierung des *dnaKJ*-Operons sind in SEQ ID NO: 15 und 16 dargestellt. Die Sequenz des *grpE*-Gens ist in SEQ ID NO: 17, die entsprechenden Primer zur Isolierung des *grpE* Gens sind in SEQ ID NO: 18 und 19 dargestellt. Die Sequenz des *clpB*-Gens ist in SEQ ID NO: 20, die entsprechenden Primer zur Isolierung des *clpB*-Gens sind in SEQ ID NO: 21 und 22 dargestellt. Zur Konstruktion von pCHAP-1 wurde das PCR-Fragment, enthaltend das *dnaKJ*-Operon, mit *Sma*I und *Bam*HI nachgeschnitten und in ein ebenfalls mit *Sma*I und *Bam*HI linearisiertes Vektorfragment von pKKT5 wie oben beschrieben ligiert. Die Konstruktion von pCHAP-2 erfolgte über eine Drei-fachligation mit dem *Eco*RI-*Pst*I-Fragment des *grpE*-Gens, dem *Pst*I-*Hind*III-Fragment des *clpB*-Gens und dem mit *Eco*RI und *Hind*III linearisierten Vektorfragment von pKKT5. pCHAP-3, in der das *clpB*-Gens alleine als Transkriptionseinheit vorliegt, leitet sich aus pCHAP-2 ab, indem das *Pst*I-*Hind*III-Fragment aus pCHAP-2 in das mit *Eco*RI und *Hind*III linearisierte Vektorfragment von pKKT5 wie oben beschrieben ligiert wurde. Vor der Ligationsreaktion wurden die nicht kompatiblen Enden der beiden Fragmente mit Klenow-Polymerase (Roche Diagnostics) nach Herstellerangaben aufbereitet. pCHAP-4 ist ein pCHAP-1 Derivat, dessen Insert um das *grpE* Gen aus pCHAP-2 erweitert wurde und somit die künstliche Transkriptionseinheit aus den Genen für DnaK, DnaJ und GrpE beinhaltet. Aufgrund der hier suboptimalen "Shine Dalgarno" Sequenz sollte die Expression von *grpE* im Vergleich zu pCHAP-2 reduziert sein und somit besser an die Expression von *dnaKJ* angepaßt sein (Diamant & Goloubinoff, 1998; Pierpaoli *et al.*, 1998). Zur Konstruktion von pCHAP-4 wurde das *Eco*RI-*Ava*I-Fragment aus pCHAP-2 in die *Bam*HI-Schnittstelle von pCHAP-1 inseriert, nachdem die nicht kompatiblen Enden der beiden Fragmente mit Klenow-Polymerase (Roche Diagnostics) nach Herstellerangaben aufbereitet wurden. Das Endkonstrukt pCHAP-5 ist ein pCHAP-4 Derivat, das als zusätzliche genetische Information das Insert von pCHAP-3 beinhaltet. Dazu wurde durch Restriktion und Ligation wie mehrfach beschrieben das *Bsp*LU11I-*Nde*I-Fragment in pCHAP 4 gegen das *Bsp*LU11I-*Ssp*I-Fragment aus pCHAP-3 ausgetauscht. Um die Kompatibilität der Enden zu gewährleisten, wurde das durch *Nde*I erzeugte, überhängende Ende zuvor mit Klenow-Polymerase (Roche Diagnostics) nach Herstellerangaben aufgefüllt.

Untersuchungen zur Überproduktion von aktiver AMV-RT wurden in Abhängigkeit des Expressionplasmids pAMV $\alpha\beta$ -4 in Kombination mit den verschiedenen Helperplasmiden, pCHAP-1 bis -5, durchgeführt. Zumindest unter den abgeänderten Standardexpressionsbedingungen steigerten alle Helperplasmide die bisherigen Ausbeuten an aktiver AM-RT deutlich, wobei das

Helperplasmid pCHAP-5 wie erwartet das beste Ergebnis lieferte. Dies konnte sowohl durch SDS-PAGE wie auch durch die anschließende Aufreinigung mit Aktivitätsbestimmung bestätigt werden.

5. Beispiel:

Analytische Methoden

5.1. Test auf Reverse Transkriptase-Aktivität (Test A)

Während der Reinigung wurde die Reverse Transkriptase-Aktivität in den Fraktionen mittels eines nicht-radioaktiven Testsystems detektiert. Dazu wurde der "Reverse Transcriptase Assay, non-radioactive" (Roche Molecular Biochemicals, Cat.No. 1468120) verwendet. Die Inkubationszeit wurde dabei auf 30 Minuten verkürzt.

5.2. Test auf Reverse Transkriptase-Aktivität (Test B)

Die spezifische Reverse Transkriptase-Aktivität der Pools wurde mittels eines radioaktiven Testsystems bestimmt. Reverse Transkriptase-Aktivität wurde in 100 µl Testvolumen (50 mM Tris/HCl, pH 8.3 (37°C), 40 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 0.5 mM dTTP, 0.04 OD260 nm Poly (A) x dT₁₅, 0.1 µM [3H]-dTTP) bestimmt. AMV-RT (5 µl) wurde in geeigneten Verdünnungen zugegeben. Nach Inkubation für 10 min. bei 37°C wurde die Reaktion mit 10 % TCA-Lösung (500 µl) abgestoppt. Das gebildete, radioaktiv markierte Produkt wurde nach der Fällung auf Nitrocellulose-Filter gewaschen. Die Einbaurate an Radioaktivität wurde im Szintillations-Zähler gemessen und die RT-Aktivität der Probe berechnet. Eine Enzymeinheit wurde dabei als die Menge an AMV-RT definiert, die in 10 min. bei 37°C den Einbau von 1.0 nMol TMP in säureunlösliches Produkt bewirkt.

5.3. Test auf DNA-Polymerase

Die Aktivität der DNA-Polymerase aus *E. coli* wurde durch Messung der Nick-Translation bestimmt. Dabei wurde die DNA-Polymerase mittels eines nicht-radioaktiven Nick-Translations-Tests nachgewiesen. Die Nick-Translation wurde in 50 µl Testvolumen durchgeführt (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM DTE, 28.875 µM DIG-dUTP, 1.444 µM Bio-16-dUTP, 95.865 µM dTTP, 20 µM dATP, 20 µM dCTP, 20 µM dGTP, 1 µg pBR322, 1 pg DNaseI). Nach

Zugabe der Proben (1 µl) wurde die Reaktion für 30 min. bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Reaktionsansatz in Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten überführt. Die weitere Behandlung und Auswertung des Tests wurde analog dem "Reverse Transcriptase Assay, non-radioactive" (Roche Molecular Biochemicals, Cat.No. 1468120) durchgeführt.

5.4. Test auf kontaminierende Aktivitäten

Der Test auf das Vorhandensein von kontaminierenden Fremdaktivitäten wurde in einer Lösung bestehend aus 10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTE durchgeführt.

Geeignete Proben der einzelnen Enzymfraktionen wurden mit den entsprechenden Nukleinsäuren inkubiert. Sogenannte Nicking-Aktivität wurde durch Inkubation mit dem Plasmid pBR322 (1 µg) für 2-16 Stunden bei 37°C nachgewiesen. Unspezifische Nukleasen wurden durch Inkubation mit Lambda-DNA/*Eco*RI, *Hind*III (1 µg) für 2-16 Stunden bei 37°C nachgewiesen. Unspezifische RNasen wurden durch Inkubation mit MSII-RNA (5 µg) für 2-4 Stunden bei 37°C nachgewiesen.

Für den Test auf Kontamination mit Exonukleasen wurden die Proben mit 4 µg [³H]-markierter DNA für 4 Stunden bei 37°C inkubiert und danach die freigesetzten [³H]-markierten Nukleotide bestimmt.

6. Beispiel: Reinigung und Funktionstest

6.1. AMV-RT aus *E. coli* LE392 pAMV- α_{lacIq} -Arg/pAMV- β_{dnAY} -His Konstrukt

6.1.1. Reinigung

Als Ausgangsmaterial für die Reinigung der rekombinanten AMV-RT wurden *E. coli*-Zellen verwendet, die beide Ketten der AMV-RT überexprimieren (siehe oben).

Die Reinigung der AMV-RT erfolgt bei 4°C. Das Reinigungsverfahren erfolgt nach Zellaufschluss und Abtrennung der Nukleinsäuren durch chromatographische Methoden. Das Reinigungsverfahren liefert eine rekombinante AMV-RT, die frei von kontaminierenden Enzymaktivitäten ist.

vitäten ist und in der RT-PCR die gleiche Funktionalität aufweist wie eine aus nativem Material gereinigte AMV-RT.

Puffer:

Puffer A: 50 mM Tris/HCl, pH 7.9, 0.5 M KCl, 0.02% Triton X-100, 20% Glycerin.

Puffer B: 20 mM Tris/HCl, pH 7.9, 0.25 M KCl, 0.02% Triton X-100, 10% Glycerin.

Puffer C: 20 mM Tris/HCl, pH 7.9, 0.25 M KCl, 0.02% Triton X-100, 10% Glycerin,
1 M Imidazol.

Puffer D: 50 mM Tris/HCl, pH 8.2, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.02% Triton X-100, 10%
Glycerin.

Puffer E: 20 mM Kaliumphosphat, pH 7.1, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.02% Triton X-100,
10% Glycerin.

Lagerpuffer: 200 mM Kaliumphosphat pH 7,2, 2 mM DTT, 0,2 % Triton X-100, 50 % Glycerin.

Aufschluß der Zellen:

Ca. 50 g Zellen von *E. coli* LE392 (pAMV- α_{lacIq} -Arg /pAMV- β_{dNAY} -His) wurden mit 200 ml Puffer A versetzt, aufgetaut und suspendiert. Die Suspension wurde mit zwei Tabletten Complete (Roche Molecular Biochemicals, Cat. No. 1697498) versetzt. Anschließend erfolgte der Aufschluß der Zellen mittels Ultraschall (Branson Sonicator) unter Kühlung (Temperatur: <10°C). Der erreichte Aufschlußgrad der Zellsuspension betrug typischerweise 40-50 %.

Fällung von Nukleinsäuren:

Anschließend erfolgte eine Entfernung der Nukleinsäuren mittels Polyminfällung. 5 ml einer 10 %-igen Polymin-P-Lösung wurden tropfenweise zugegeben. Bei unvollständiger Fällung erfolgte eine weitere tropfenweise Zugabe. Nach Inkubation für 30 min bei 4°C erfolgte eine Zentrifugation (30 min, 13000 upm, 4°C).

Chromatographische Reinigungen:

Affinitätschromatographie an Ni-Chelat-Säule:

Der klare Zentrifugationsüberstand wurde mit Puffer B verdünnt (1+1) und auf eine mit Puffer B äquiliabierte und mit Nickel beladene Chelating Sepharose ff-Säule (2.6 cm x 10 cm, Pharmacia) aufgezogen; danach wurde mit ca. 500 ml Puffer B, danach mit jeweils 200 ml Puffer B + 10 mM Imidazol und 200 ml Puffer B + 20 mM Imidazol gewaschen. Das Enzym wurde mit einem linearen Gradienten aus Puffer B + 20 mM Imidazol und Puffer C in einem Gesamtvolu-

men von 500 ml eluiert. Die Fließgeschwindigkeit betrug 5 ml pro Minute, die Fraktionsgröße 20 ml pro Fraktion. Das Enzym eluierte zwischen 50 mM und 200 mM Imidazol. Der Pool der aktiven Fraktionen wurde gegen Puffer D dialysiert.

Chromatographie an Heparin-Sepharose:

Der dialysierte Pool wurde danach auf eine mit Puffer D äquilibrierte Heparin-Sepharose ff-Säule (1.6 cm x 10 cm, Pharmacia) aufgezogen und mit ca. 200 ml Puffer D, danach mit ca. 200 ml Puffer D + 300 mM KCl gewaschen. Die Elution des Enzyms erfolgte mit einem linearen Gradienten aus Puffer D + 300 mM KCl und Puffer D+1 M KCl in einem Gesamtvolumen von 200 ml. Die Fließgeschwindigkeit betrug 2.5 ml pro min, Fraktionsgröße 10 ml. Die AMV-RT eluierte bei einer KCl-Konzentration von 500 mM bis 700 mM.

Chromatographie an S-Sepharose ff:

Die RT-aktiven Fraktionen wurden gepoolt und gegen Puffer E dialysiert. Das Dialysat wurde auf eine mit Puffer E äquilibrierte S-Sepharose ff-Säule (1.6 cm x 10 cm, Pharmacia) geladen. Nach dem Waschen mit ca. 200 ml Puffer E wurde das Enzym mit einem linearen Gradienten aus Puffer E und Puffer E + 1 M KCl in einem Gesamtvolumen von 400 ml eluiert. Die Fließgeschwindigkeit war 2.5 ml pro Minute, die Fraktionsgröße 10 ml.

Chromatographie an Hydroxylapatit:

Die RT-aktiven Fraktionen wurden gepoolt und gegen Puffer E dialysiert. Das Dialysat wurde auf eine mit Puffer E äquilibrierte HA-Ultrogel-Säule (1.6 cm x 10 cm, Biosepra) geladen. Nach dem Waschen mit ca. 200 ml Puffer E wurde das Enzym mit einem linearen Gradienten aus Puffer E und Puffer E + 0.5 M Kaliumphosphat in einem Gesamtvolumen von 400 ml eluiert. Die Fließgeschwindigkeit war 2.5 ml pro Minute, die Fraktionsgröße 10 ml.

Die RT-aktiven Fraktionen wurden gepoolt und gegen Lagerpuffer dialysiert. Das gereinigte Protein wurde mit SDS- und β -Mercaptoethanol-haltigen Auftragspuffer versetzt und die Probe durch Kochen (5 min 100°C) denaturiert. Anschließend wurde je 20 μ l mittels eines analytischen SDS-Gels (4-20 %) analysiert (Laemmli U.K., 1970, *Nature* 227:555-557). Dabei wurden die α - und β -Untereinheiten der AMV-RT in äquimolaren Verhältnissen gefunden.

Die beschriebene Methode liefert eine stabile AMV-RT mit einer äquimolaren Verteilung der α - und β - Untereinheiten. Das erhaltene Enzym ist in der RT-PCR funktionsfähig.

6.1.2. Funktionstest in RT-PCR

Die erhaltene rekombinante AMV reverse Transkriptase wurde in einem Funktionstest untersucht. Der Funktionstest bestand aus einer Reversen Transkription (RT), gekoppelt mit einer Polymerasekettenreaktion (PCR). Dazu wurden 5 Einheiten der rekombinanten AMV reverse Transkriptase analog der Enzym-Mischung des Titan TM One Tube PCR System (Cat. No 1888382, Roche Molecular Biochemicals) eingesetzt. Amplifiziert wurde ein 1.8 kb großes Fragment des humanen Dystrophin-Genes. Als Template wurden 10 ng humane Muskel-RNA verwendet. Verwendete Primer (400 nM) waren Dys Primer 2rev (5'-GAG TGA ATA CAG TTT GCC CAT GGA TTG-3') und Dys Primer 8for (5'-AAG AAG TAG AGG ACT GTT ATG AAA GAG AAG-3'). Das Target wurde mit folgendem Programm in einer RT-PCR amplifiziert: 50°C für 30 min, 94°C für 2 min, gefolgt von 10 Zyklen (94°C für 10 sec, 58°C für 30 sec, 68°C für 1 min 10 sec) und 20 Zyklen (94°C für 10 sec, 58°C für 30 sec, 68°C für 1 min 10 sec; + 10 sec/Zyklus). Anschließend bei 68°C für 7 min Inkubiert. Die Reaktionsprodukte der RT-PCR wurden nach dem Abgestoppen auf einem 1 %-igen Agarose-Gel aufgetrennt (Abb. 1).

Abbildung 1 zeigt das Amplifikationsprodukt der RT-PCR mit einer Größe von 1.8 kb, erhalten mit nativ gereinigter AMV-RT (Spur 2) und rekombinant erhaltener AMV-RT (Spur 3). Die Spuren 1 und 4 zeigen einen DNA-Molekulargewichtsmarker VI (Cat. No. 1062590, Roche Molecular Biochemicals).

6.2. AMV-RT aus *E. coli* LE392 pAMV $\alpha\beta$ -4 +pCHAP-5 Konstrukt

6.2.1. Reinigung

Als Ausgangsmaterial für die Reinigung der rekombinanten AMV-RT wurden *E. coli* LE392 pAMV $\alpha\beta$ -4 +pCHAP-5 Zellen verwendet, die beide Ketten der AMV-RT überexprimieren (siehe oben).

Die Reinigung der AMV-RT erfolgt bei 4°C. Das Reinigungsverfahren erfolgt nach Zellaufschluss und Abtrennung der Nukleinsäuren durch chromatographische Methoden. Das Reinigungsverfahren liefert eine rekombinante AMV-RT, die frei von kontaminierenden Enzymaktivitäten ist und in der RT-PCR die gleiche Funktionalität aufweist wie eine aus nativem Material gereinigte AMV-RT.

Puffer:

Puffer A: 50 mM NaPO₄, pH 7,2, 1 M NaCl, 3 mM 2-Mercaptoethanol, 10% Glycerin.

Puffer B: 50 mM NaPO₄, pH 5,0, 1 M NaCl, 3 mM 2-Mercaptoethanol, 10% Glycerin

Puffer C: 50 mM NaPO₄, pH 6,0, 1 M NaCl, 3 mM 2-Mercaptoethanol, 10% Glycerin
0,2 M Imidazol.

Puffer D: 50 mM NaPO₄, pH 7,7, 1 M NaCl, 3 mM 2-Mercaptoethanol, 10% Glycerin
0,5 M Imidazol.

Puffer E: 50 mM NaPO₄, pH 6,0, 3 mM 2-Mercaptoethanol, 10% Glycerin

Lagerpuffer: 200 mM Kaliumphosphat pH 7,2, 2 mM DTT, 0,2 % Triton X-100, 50 % Glycerin.

Aufschluß der Zellen:

Ca. 50 g Zellen von *E. coli* LE392 pAMVαβ-4 +pCHAP-5 wurden mit 400 ml Puffer A versetzt, aufgetaut und suspendiert. Die Suspension wurde mit zwei Tabletten Complete (Roche Molecular Biochemicals, Cat. No. 1697498) versetzt. Anschließend erfolgte der Aufschluß der Zellen mittels Ultraschall (Branson Sonicator) unter Kühlung (Temperatur: <10°C). Der erreichte Aufschlußgrad der Zellsuspension betrug typischerweise 40-50 %.

Fällung von Nukleinsäuren:

Anschließend erfolgte eine Entfernung der Nukleinsäuren mittels Polyminfällung. 5 ml einer 10 %-igen Polymin-P-Lösung wurden tropfenweise zugegeben. Bei unvollständiger Fällung erfolgte eine weitere tropfenweise Zugabe. Nach Inkubation für 30 min bei 4°C erfolgte eine Zentrifugation (30 min, 13000 upm, 4°C).

*Chromatographische Reinigungen:**Affinitätschromatographie an Ni-Chelat-Säule:*

Der klare Zentrifugationsüberstand wurde auf eine mit Puffer A equilibrierte und mit Nickel beladene Chelating Sepharose ff-Säule (2,6 cm x 10 cm, Pharmacia) aufgezogen; danach wurde mit ca. 500 ml Puffer A, danach mit jeweils 500 ml Puffer B und 500 ml Puffer C gewaschen. Das Enzym wurde mit Puffer D in einem Gesamtvolumen von 500 ml eluiert. Die Fließgeschwindigkeit betrug 5 ml pro Minute, die Fraktionsgröße 20 ml pro Fraktion. Der Pool der aktiven Fraktionen wurde gegen Puffer E dialysiert.

Chromatographie an Heparin-Sepharose:

Der dialysierte Pool wurde danach auf eine mit Puffer E + 250 mM NaCl äquilibrierte Heparin-Sepharose ff-Säule (1.6 cm x 10 cm, Pharmacia) aufgezogen und mit ca. 200 ml Puffer E + 250 mM NaCl gewaschen. Die Elution des Enzyms erfolgte mit einem linearen Gradienten aus Puffer E und 250 mM NaCl und Puffer E und 1 M NaCl in einem Gesamtvolumen von 200 ml. Die Fließgeschwindigkeit betrug 2.5 ml pro min, Fraktionsgröße 10 ml. Die AMV-RT eluierte bei einer NaCl-Konzentration von 500 mM bis 700 mM.

Die RT-aktiven Fraktionen wurden gepoolt und gegen Lagerpuffer dialysiert. Das gereinigte Protein wurde mit SDS- und 2-Mercaptoethanol-haltigen Auftragspuffer versetzt und die Probe durch Kochen (5 min 100°C) denaturiert. Anschließend wurde je 20 µl mittels eines analytisches SDS-Gels (4-20 %) analysiert (Laemmli U.K., 1970, *Nature* 227:555-557). Dabei wurden die α - und β -Untereinheiten der AMV-RT in äquimolaren Verhältnissen gefunden. (Abb. 2, Spur 6).

Abbildung 2 zeigt ein SDS-Gel mit Proben aus der AMV-RT Aufreinigung.

Spur 1: Molekulargewichtsmarker

Spur 2: AMV nativ

Spur 3: Zellaufschluss

Spur 4: Ni-Chelat Sepharose, Wasch mit Puffer C

Spur 5: Ni-Chelat Pool

Spur 6: AMV-RT rec., Endpräparat

Die beschriebene Methode liefert eine stabile AMV-RT mit einer äquimolaren Verteilung der α - und β - Untereinheiten. Das erhaltene Enzym ist in der RT-PCR funktionsfähig.

6.2.2. Funktionstest in RT-PCR

Die erhaltene rekombinante AMV reverse Transkriptase wurde in einem Funktionstest untersucht. Der Funktionstest bestand aus einer reversen Transkription (RT), gefolgt von einer Polymerasekettenreaktion (PCR). Dazu wurden 10 Einheiten der rekombinanten AMV reverse Transkriptase eingesetzt. Amplifiziert wurde ein 8 kb, 10 kb, 12 kb und ein 13,5 kb großes Fragment des humanen Dystrophin-Genes.

Als Template wurden 1 µg humane Muskel-RNA verwendet. Verwendete Primer (400 nM) waren Dys Primer 2 for (5'-CAA TCC ATG GGC AAA CTG TAT TCA CTC -3') und Dys

Primer 5 rev (5'-CGT CCC GTA TCA TAA ACA TTC AGC AGC-3') für 8 kb, Dys Primer 8 for (5'-AAG AAG TAG AGG ACT GTT ATG AAA GAG AA-3') und 5 rev für 10 kb, Dys Primer 8 for und Dys Primer 9 rev (5'-AGC AGG TAA GCC TGG ATG ACT GAC TAG AAG-3') für 12 kb und Dys Primer 8 for und 10 rev (5'-AAT CAA TCA ACC AAC CGA AAT CTC ACT CTG-3') für 13,5 kb. Die cDNA Synthese erfolgt bei 42°C für 60 min.

Die Durchführung der cDNA Synthese erfolgte nach Vorgaben der Produktinformation für AMV reverse Transcriptase (Cat. No. 1495062, Roche Molecular Biochemicals).

Für die PCR wurde das Expand Long Template PCR System (Cat. No. 1681834, Roche Molecular Biochemicals) verwendet. Das Target wurde mit folgendem PCR-Programm amplifiziert: 94°C für 2 min, gefolgt von 10 Zyklen (94°C für 10 sec, 60°C für 30 sec, 68°C für 10 min) und 20 Zyklen (94°C für 10 sec, 60°C für 30 sec, 68°C für 10 min 10 + 10 sec/Zyklus). Anschließend bei 68°C für 5 min Inkubiert. Die Reaktionsprodukte der RT-PCR wurden nach dem Abgestoppen auf einem 1 %-igen Agarose-Gel aufgetrennt (Abb. 3). Die Spuren 3 und 6 zeigen einen DNA-Molekulargewichtsmarker X (Cat. No. 1498037, Roche Molecular Biochemicals).

Abbildung 3 zeigt ein Agarose-Gel, auf dem die Reaktionsprodukte der RT-PCT mit rekomb. AMV-RT aufgetrennt wurden; Spur 1: 8 Kb Amplifikationsprodukt, Spur 2: 10 Kb Amplifikationsprodukt, Spur 3: DNA Längenstandard X, Spur 4: 12 Kb Amplifikationsprodukt, Spur 5: 13,5 Kb Amplifikationsprodukt, Spur 6: DNA Längenstandard X.

SEQUENCE LISTING

<110> Focche Diagnostics GmbH

<113> Verfahren zur Herstellung einer aktiven, heterodimeren AMV-RT in prokaryotischen Zellen

<130> 5272/00/DE

<140>
<141>

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer<400> 1
gatqactgga attcatgact gttgcgcctac atctggct

38

<210> 2
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer<400> 2
gatqactgct gcagttatta tgcaaaaaaga gggctcgct

40

<210> 3
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer<400> 3
gatqactgct gcagttatta atacccttga aagggtggctt g

41

<210> 4
<211> 1716
<212> DNA
<213> Avian Myeloblastosis Virus<400> 4
actgttgcgc tacatctggc tattccgctc aaatggaaac caaaccacac gcctgtgtgg 60
atggaccagt gcccccttc tgaaggtaaa cttgttagcgc taaccaatt agtggaaaaaa 120
gtattacagt taggacatat agaaccttca ctttagttgtt gjaacacacc tgcgttgtg 180
atccggaaagg ctgcgggtc ttatcgctt ttgcgtact tgcgcgtgt taacgctaag 240
cttggttccctt ttggggccgt ccaacagggg jgcgcgggtc tttccgcgtt cccgcgtggc 300
tggcccttga tggctctaga cctcaaggat tgcttcttt ctatccctt tgcggaaaca 360
gatcgcgaag cttttgcat tgcgtcccc tctgtgaata accaggcccs cgctcgaaga 420
ttccaatggg aggttgcgc ccaaggatg acctgttctc ccactatctg tcagttgata 480

gtgggtcaaa tacttgagcc cttgggactc aaggcacccat ctgtgcgtcat gttgcattat 540
 atggatgatc ttgtgttagt cgcctcaagt catgatgggt tggaaggccc aggaggag 600
 gttatcgta catggaaaag agccgggttc accatttcgc ctgataaggt ccagagggag 660
 cccggagtagac aatatcttgg gtacaagttt ggcagttacgt atgtacgcacc cgtaggccctg 720
 gtagcagaac ccaggatagc caccttggat gatgttccaga agctgttggg gtcacttcag 780
 tggcttcgcc cagcgcttagg aatccccctt cgcactgtatgg gccccttta tgagcagttt 840
 cgagggtcag atccataacga ggcgaggggaa tggaaatctag acatgaaaat ggctggaga 900
 gagatcgatc agctcagcac cactgtgtcc ttggaaacgtt gggacccctgc ctgtgcctcg 960
 gaaggagccgg tggtagatgt tggacagggg gcaatagggg tccctggaca gggactgtcc 1020
 acacacccaa ggcattgttt gtggttatcc tccacccaaac ccaccaaggc gtttactgtt 1080
 tggtagaaag tgcctaccctt ttgtattact aagctacgtt ctgcggcagt gccaaccttt 1140
 ggcaaggagg ttgatataccctt ctgtttgtt gatgtttttt gggaggaccc tccgctcccg 1200
 gaggggatcc tggtagccctt tgggggtttt gcaaggaaaaaa tcaggagtag tgacacgcac 1260
 tctatttttgc acattggccg tccactgtat gtttctctgaa aagtgggggtt taccgaccac 1320
 cctgtaccgg gaccactgtt cttaaccac ggcctcccttta gcacccataaa ggggggtggta 1380
 gtctggaggg agggcccaag gtggggagata aaagaaaatag ctgattttggg ggcatagtgtt 1440
 caacaactgg aagcacggcc tggccatcg gcaacttctgc tggcccgac aacgcccact 1500
 aatgtatgttga ctgactctgc gtttggccgtt aaaaatgttac tcaagatggg gcaaggaggaa 1560
 gtcccgctca cagcgccggg ttttttttta gaggatgcgt taagccaaag gtcagccatg 1620
 gccgcgggttc tccacgttgcg gagtattttt gagggtccag ggtttttcac agaaggaaat 1680
 gacgtggcag atagccaaacg cacctttcaaa gcgttat 1716

<210> 5
 <211> 2574
 <212> DNA
 <213> Avian Myeloblastosis Virus

<400> 5

actgttgcgc tacatctgg tattccgctc aaatggaaagc caaaccacac gctgtgtgg 60
 attgaccagt gcccccttc tgaaggtaaa ctgtgtacgc taacgcatt agtgtggaaaaa 120
 gaattacagt taggacataat agaaccttca cttagttgtt ggaacacacc tggttttgtt 180
 atccggaaagg ctccgggttc ttatcgcttta ttgcattgtact tgcgcgtgtt taacgcataag 240
 ctgtttctt tggggccgtt ccaacagggg ggcgcgggttc tctccgcgtt cccgcgttgc 300
 tggcccttga tggccctttagt cctcaaggat tggccctttt ctatcccttct tggggaaacaa 360
 gatcgcaag cttttgcatt tgcgtcccc tgggttgcata accaggcccccc cgctcgaaaga 420
 ttccaatggaa agtgttgcg ccaaggatgtt acctgttctc ccactatctgtt tgggttgcata 480
 gtgggtcaaa taattggatc ttgtgtactc aacccatctt ctgtgcgtat gttgcattat 540
 atggatgatc ttgtgttagt cgcctcaagt catgatgggtt tgaaaggccgc aggaggag 600
 gttatcgta cattggaaag agccgggttc accatttcgc ctgataaggtt ccaggaggag 660
 cccggagtagac aatatacttgc gtacaatgtt ggcagttacgtt atgtacgcacc ggttggccctg 720
 gtagcagaac ccaggatgtt caccattgtt gatgttccaga agctgttggg gtcacttcag 780
 tggcccttgc cagcgcttgc aatcccgctt cgcactgtatgg gcccctttta tgagcagttt 840
 cgagggtcag atccataacga ggcgaggggaa tggaaatctag acatgaaaat ggcctggaga 900
 gagatcgatc agctcagcac cactgtgtcc ttggaaacgtt gggacccctgc cctgcctctg 960
 gaggagccgg tggtagatgtt tgggggtttt gcaaggaaaaaa tcaggagtag tgacacgcac 1020
 tctatttttgc acattggccg tccactgtat gtttctctgaa aagtgggggtt tcccgacccac 1080
 cctgtaccgg gaccactgtt cttaaccac ggcctcccttta gcacccataaa ggggggtggta 1140
 gtctggaggg agggcccaag gtggggagata aaagaaaatag ctgatttttggg ggcatagtgtt 1200
 caacaactgg aagcacggcc tggccatcg gcaacttctgc tggcccgac aacgcccact 1260
 aatgtatgttga ctgactctgc gtttggccgtt aaaaatgttac tcaagatggg gcaaggaggaa 1320
 gtcccgctca cagcgccggc ttttttttta gaggatgcgtt taagccaaag gtcagccatg 1380
 gccgcgggttc tccacgttgcg gaggatgttctt gaaatgttac tcaagatggg gcaaggaggaa 1440
 gacgtggcag atagccaaacg cacctttcaaa ggcgtatccct tggagtaggc taaagatctc 1500
 cataccgctc tccatataccg acccccgccgc statccaaag cgtgtatataat atctatgcac 1560
 caggcttaggg aggttggcc gacccgtcccg cattgtatccgtt cccgccttgc gttggaggcc 1620
 ggggtaaacc ctaggggtttt gggaccccta cagatatggc agacagactt taaactagag 1680
 cctagaatgg ctcccggttc ctggctcgat gttactgtgg ataccgcctc atctgcgata 1740
 gtcgttaactc agatggccg tggccatcg gttgtgcac aacatcatttgc ggcacccgtt 1800
 atcgccgttt tggaaagacc aaaggccata aaaacagata atgggtccctg ctccacgtct 1860

aaatccacgc gagagtggct cgcgagatgg gggatagcac acaccaccgg gattccgggt 2160
 aattcccaagg gtcaagctat ggttagagcgg gccaacccgc tcttcaaaga taagatccgt 2220
 gtgtttgcgg agggggatgg ctttatgaaa agatccccca ccagcaaaca gggggaaacta 2280
 tttagccaaagg caatgtatgc ctttaatcac ttgtggctgt gtgaaaacac aaaaacaccg 2340
 atacaaaaac actggagacc taccgttstt acagaaggac ccccggttaa aatacgaata 2400
 gagacaggggg agtggggaaa agatggAAC gtgtggctgt ggggacgagg ttatgcagct 2460
 gtgaaaaaca gggacactga taaggttatt tggttaccct ctggaaaagt taaaccggac 2520
 atggcccaaa aggatgaggt gactaagaaa gatgaggcga gcccctttt tgca 2574

::110> 6
 ::111> 572
 ::112> PRT
 ::113> Avian Myeloblastosis Virus

::400> 6
 Thr Val Ala Leu His Leu Ala Ile Pro Leu Lys Trp Lys Pro Asn His
 1 5 10 15
 Thr Pro Val Trp Ile Asp Gln Trp Pro Leu Pro Glu Gly Lys Leu Val
 20 25 30
 Ala Leu Thr Gln Leu Val Glu Lys Glu Leu Gln Leu Gly His Ile Glu
 35 40 45
 Pro Ser Leu Ser Cys Trp Asn Thr Pro Val Phe Val Ile Arg Lys Ala
 50 55 60
 Ser Gly Ser Tyr Arg Leu Leu His Asp Leu Arg Ala Val Asn Ala Lys
 65 70 75 80
 Leu Val Pro Phe Gly Ala Val Gln Gln Gly Ala Pro Val Leu Ser Ala
 85 90 95
 Leu Pro Arg Gly Trp Pro Leu Met Val Leu Asp Leu Lys Asp Cys Phe
 100 105 110
 Phe Ser Ile Pro Leu Ala Glu Gln Asp Arg Glu Ala Phe Ala Phe Thr
 115 120 125
 Leu Pro Ser Val Asn Asn Gln Ala Pro Ala Arg Arg Phe Gln Trp Lys
 130 135 140
 Val Leu Pro Gln Gly Met Thr Cys Ser Pro Thr Ile Cys Gln Leu Ile
 145 150 155 160
 Val Gly Gln Ile Leu Glu Pro Leu Arg Leu Lys His Pro Ser Leu Arg
 165 170 175
 Met Leu His Tyr Met Asp Asp Leu Leu Leu Ala Ala Ser Ser His Asp
 180 185 190
 Gly Leu Glu Ala Ala Gly Glu Glu Val Ile Ser Thr Leu Glu Arg Ala
 195 200 205
 Gly Phe Thr Ile Ser Pro Asp Lys Val Gln Arg Glu Pro Gly Val Gln
 210 215 220
 Tyr Leu Gly Tyr Lys Leu Gly Ser Thr Tyr Val Ala Pro Val Gly Leu
 225 230 235 240
 Val Ala Glu Pro Arg Ile Ala Thr Leu Trp Asp Val Gln Lys Leu Val
 245 250 255

Gly Ser Leu Gln Trp Leu Arg Pro Ala Leu Gly Ile Pro Pro Arg Leu
 260 265 270
 Met Gly Pro Phe Tyr Glu Gln Leu Arg Gly Ser Asp Pro Asn Glu Ala
 275 280 285
 Arg Glu Trp Asn Leu Asp Met Lys Met Ala Trp Arg Glu Ile Val Gln
 290 295 300
 Leu Ser Thr Thr Ala Ala Leu Glu Arg Trp Asp Pro Ala Leu Pro Leu
 305 310 315 320
 Glu Gly Ala Val Ala Arg Cys Glu Gln Gly Ala Ile Gly Val Leu Gly
 325 330 335
 Gln Gly Leu Ser Thr His Pro Arg Pro Cys Leu Trp Leu Phe Ser Thr
 340 345 350
 Gln Pro Thr Lys Ala Phe Thr Ala Trp Leu Glu Val Leu Thr Leu Leu
 355 360 365
 Ile Thr Lys Leu Arg Ala Ser Ala Val Arg Thr Phe Gly Lys Glu Val
 370 375 380
 Asp Ile Leu Leu Leu Pro Ala Cys Phe Arg Glu Asp Leu Pro Leu Pro
 385 390 395 400
 Glu Gly Ile Leu Leu Ala Leu Arg Gly Phe Ala Gly Lys Ile Arg Ser
 405 410 415
 Ser Asp Thr Pro Ser Ile Phe Asp Ile Ala Arg Pro Leu His Val Ser
 420 425 430
 Leu Lys Val Arg Val Thr Asp His Pro Val Pro Gly Pro Thr Val Phe
 435 440 445
 Thr Asp Ala Ser Ser Ser Thr His Lys Gly Val Val Val Trp Arg Glu
 450 455 460
 Gly Pro Arg Trp Glu Ile Lys Glu Ile Ala Asp Leu Gly Ala Ser Val
 465 470 475 480
 Gln Gln Leu Glu Ala Arg Ala Val Ala Met Ala Leu Leu Leu Trp Pro
 485 490 495
 Thr Thr Pro Thr Asn Val Val Thr Asp Ser Ala Phe Val Ala Lys Met
 500 505 510
 Leu Leu Lys Met Gly Gln Glu Gly Val Pro Ser Thr Ala Ala Ala Phe
 515 520 525
 Ile Leu Glu Asp Ala Leu Ser Gln Arg Ser Ala Met Ala Ala Val Leu
 530 535 540
 His Val Arg Ser His Ser Glu Val Pro Gly Phe Phe Thr Glu Gly Asn
 545 550 555 560
 Asp Val Ala Asp Ser Gln Ala Thr Phe Gln Ala Tyr
 565 570

<210> 7
 <211> 858
 <212> PRT
 <213> Avian Myeloblastosis Virus

<400> 7
 Thr Val Ala Leu His Leu Ala Ile Pro Leu Lys Trp Lys Pro Asn His
 1 5 10 15
 Thr Pro Val Trp Ile Asp Gln Trp Pro Leu Pro Glu Gly Lys Leu Val
 20 25 30
 Ala Leu Thr Gln Leu Val Glu Lys Glu Leu Gln Leu Gly His Ile Glu
 35 40 45
 Pro Ser Leu Ser Cys Trp Asn Thr Pro Val Phe Val Ile Arg Lys Ala
 50 55 60
 Ser Gly Ser Tyr Arg Leu Leu His Asp Leu Arg Ala Val Asn Ala Lys
 65 70 75 80
 Leu Val Pro Phe Gly Ala Val Gln Gln Gly Ala Pro Val Leu Ser Ala
 85 90 95
 Leu Pro Arg Gly Trp Pro Leu Met Val Leu Asp Leu Lys Asp Cys Phe
 100 105 110
 Phe Ser Ile Pro Leu Ala Glu Gln Asp Arg Glu Ala Phe Ala Phe Thr
 115 120 125
 Leu Pro Ser Val Asn Asn Gln Ala Pro Ala Arg Arg Phe Gln Trp Lys
 130 135 140
 Val Leu Pro Gln Gly Met Thr Cys Ser Pro Thr Ile Cys Gln Leu Ile
 145 150 155 160
 Val Gly Gln Ile Leu Glu Pro Leu Arg Leu Lys His Pro Ser Leu Arg
 165 170 175
 Met Leu His Tyr Met Asp Asp Leu Leu Ala Ala Ser Ser His Asp
 180 185 190
 Gly Leu Glu Ala Ala Gly Glu Glu Val Ile Ser Thr Leu Glu Arg Ala
 195 200 205
 Gly Phe Thr Ile Ser Pro Asp Lys Val Gln Arg Glu Pro Gly Val Gln
 210 215 220
 Tyr Leu Gly Tyr Lys Leu Gly Ser Thr Tyr Val Ala Pro Val Gly Leu
 225 230 235 240
 Val Ala Glu Pro Arg Ile Ala Thr Leu Trp Asp Val Gln Lys Leu Val
 245 250 255
 Gly Ser Leu Gln Trp Leu Arg Pro Ala Leu Gly Ile Pro Pro Arg Leu
 260 265 270
 Met Gly Pro Phe Tyr Glu Gln Leu Arg Gly Ser Asp Pro Asn Glu Ala
 275 280 285
 Arg Glu Trp Asn Leu Asp Met Lys Met Ala Trp Arg Glu Ile Val Gln
 290 295 300

Leu Ser Thr Thr Ala Ala Leu Glu Arg Trp Asp Pro Ala Leu Pro Leu
 305 310 315 320
 Glu Gly Ala Val Ala Arg Cys Glu Gln Gly Ala Ile Gly Val Leu Gly
 325 330 335
 Gln Gly Leu Ser Thr His Pro Arg Pro Cys Leu Trp Leu Phe Ser Thr
 340 345 350
 Gln Pro Thr Lys Ala Phe Thr Ala Trp Leu Glu Val Leu Thr Leu Leu
 355 360 365
 Ile Thr Lys Leu Arg Ala Ser Ala Val Arg Thr Phe Gly Lys Glu Val
 370 375 380
 Asp Ile Leu Leu Leu Pro Ala Cys Phe Arg Glu Asp Leu Pro Leu Pro
 385 390 395 400
 Glu Gly Ile Leu Leu Ala Leu Arg Gly Phe Ala Gly Lys Ile Arg Ser
 405 410 415
 Ser Asp Thr Pro Ser Ile Phe Asp Ile Ala Arg Pro Leu His Val Ser
 420 425 430
 Leu Lys Val Arg Val Thr Asp His Pro Val Pro Gly Pro Thr Val Phe
 435 440 445
 Thr Asp Ala Ser Ser Ser Thr His Lys Gly Val Val Val Trp Arg Glu
 450 455 460
 Gly Pro Arg Trp Glu Ile Lys Glu Ile Ala Asp Leu Gly Ala Ser Val
 465 470 475 480
 Gln Gln Leu Glu Ala Arg Ala Val Ala Met Ala Leu Leu Leu Trp Pro
 485 490 495
 Thr Thr Pro Thr Asn Val Val Thr Asp Ser Ala Phe Val Ala Lys Met
 500 505 510
 Leu Leu Lys Met Gly Gln Glu Gly Val Pro Ser Thr Ala Ala Ala Phe
 515 520 525
 Ile Leu Glu Asp Ala Leu Ser Gln Arg Ser Ala Met Ala Ala Val Leu
 530 535 540
 His Val Arg Ser His Ser Glu Val Pro Gly Phe Phe Thr Glu Gly Asn
 545 550 555 560
 Asp Val Ala Asp Ser Gln Ala Thr Phe Gln Ala Tyr Pro Leu Arg Glu
 565 570 575
 Ala Lys Asp Leu His Thr Ala Leu His Ile Gly Pro Arg Ala Leu Ser
 580 585 590
 Lys Ala Cys Asn Ile Ser Met Gln Gln Ala Arg Glu Val Val Gln Thr
 595 600 605
 Cys Pro His Cys Asn Ser Ala Pro Ala Leu Glu Ala Gly Val Asn Pro
 610 615 620
 Arg Gly Leu Gly Pro Leu Gln Ile Trp Gln Thr Asp Phe Thr Leu Glu
 625 630 635 640

Pro Arg Met Ala Pro Arg Ser Trp Leu Ala Val Thr Val Asp Thr Ala
 645 650 655
 Ser Ser Ala Ile Val Val Thr Gln His Gly Arg Val Thr Ser Val Ala
 660 665 670
 Ala Gln His His Trp Ala Thr Ala Ile Ala Val Leu Gly Arg Pro Lys
 675 680 685
 Ala Ile Lys Thr Asp Asn Gly Ser Cys Phe Thr Ser Lys Ser Thr Arg
 690 695 700
 Glu Trp Leu Ala Arg Trp Gly Ile Ala His Thr Thr Gly Ile Pro Gly
 705 710 715 720
 Asn Ser Gln Gly Gln Ala Met Val Glu Arg Ala Asn Arg Leu Leu Lys
 725 730 735
 Asp Lys Ile Arg Val Leu Ala Glu Gly Asp Gly Phe Met Lys Arg Ile
 740 745 750
 Pro Thr Ser Lys Gln Gly Glu Leu Leu Ala Lys Ala Met Tyr Ala Leu
 755 760 765
 Asn His Phe Glu Arg Gly Glu Asn Thr Lys Thr Pro Ile Gln Lys His
 770 775 780
 Trp Arg Pro Thr Val Leu Thr Glu Gly Pro Pro Val Lys Ile Arg Ile
 785 790 795 800
 Glu Thr Gly Glu Trp Glu Lys Gly Trp Asn Val Leu Val Trp Gly Arg
 805 810 815
 Gly Tyr Ala Ala Val Lys Asn Arg Asp Thr Asp Lys Val Ile Trp Val
 820 825 830
 Pro Ser Arg Lys Val Lys Pro Asp Ile Ala Gln Lys Asp Glu Val Thr
 835 840 845
 Lys Lys Asp Glu Ala Ser Pro Leu Phe Ala
 850 855

```

>110> 8
>111> 62
>112> DNA
>113> Artificial Sequence

>120>
>123> Description of Artificial Sequence: Primer

>400> 8
gtatgacttggaa attccatgcgt cggccgtcgcc gtcggccgtcg cactgttgcg ctacatctgg 60
62

>110> 9
>111> 65
>112> DNA
>113> Artificial Sequence

>120>
>123> Description of Artificial Sequence: Primer
  
```

<400> 9
 gatjactgga attcatgaga ggzaggccacc atcaccatca ccatactgtt gogctacatc 60
 tqjct 65

<210> 10
 <211> 425
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<400> 10
 ctgtttggc ggatgagaga agatttttag cctgatacag attaaatcg aacgcagaag 60
 cggctgtata aaacagaatt tgcctggcg cagtagcjcg gtggtccccac ctgaccccat 120
 gcccgaactca gaagtggaaac gccgtagcgc cgatggtagt gtggggtctc cccatgcgag 180
 agtagggaaac tgccaggcat caaataaaac gaaaggctca gtcgaaaagac tgggccttc 240
 gttttatctg ttgtttgtcg gtgaacgctc tcctgatgt gacaaatccg ccgggagcgg 300
 atttgaacjt tgsgaagcaa cggcccccggag ggtggccggc aggacgcccgg ccataaaactg 360
 ccaggcatca aattaaggcag aaggccatgc tgacggatgg ctttttgcg tttctacaaa 420
 ctctt 425

<210> 11
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 11
 aaaactgtag agcagtaagc cggtcataaaa a 31

<210> 11
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 11
 aaaactgtag cgtgctggat gaaagtgtatt a 31

<210> 13
 <211> 2155
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<400> 13
 atccaaatcc ttttttttttt tcccccttga aaaaaaaaaaag cctccatcccc attttctcttg 70
 tttcccaaaaaa gggaaaccacg taagctccgg cgtcacccat aacagatacg gactttctca 120
 aaggagagtt atcaatgtat attcgtccat tgcataatcg cgtgatcgta aacgtaaag 180
 aatgtccaaac taaatctgtt ggcggatcg ttctgaccgg ctctgcagcg gctaaatcca 240
 cccggccggcg agtgctggat gtcggcaatg gccgtatctt tgaaaatggc gaagtgaagc 300
 cgttgtgtgt gaaagttggc gacatgtta tttcaacga tggctacggt gtgaaatctg 360
 agaagatcga caatgaagaa gtgttgcata tgcggaaag cgcacattctg gcaattgttg 420
 aacgtataatc cgccgcacgac actgaacata cgaatttaag gaataaaagat aatggcagct 480
 aaagacgtaa aattcggtaa cgacgctcggt gtgaaaatgc tgcggccgt aaacgtactg 540
 gcaagatcgaa tggaaagttac cctcggttca aaaggccgta acgtatctt ggataaatct 600
 ttccgggtgcac cgaccatcac caaagatggt gttcccggtt ctcgtgaaat cgaactgaa 660
 gacaaggatcg aaaaatatggg tgcgcagatg gtgaaaagaaat ttgcctctaa agcaaacgac 720
 gctgcaggcg acggtaccac cactgcaacc gtactggctc aggctatcat cactgaaggt 780
 tggaaagctg ttgtcgccgg catgaaccccg atggacctga aacgtggat cgacaaaagcg 840
 gtttacgcgtc cagttgaaaga actgaaaagcg stgtccgtac catgctctga ctctaaagcg 900
 attgtctagg ttggtaccat ctccgctaac tccgacgaaa ccgttaggtaa actgatcgct 960

```

gaaggcgtgg acaaagtccgg taaagaaggc gttatcacgg ttgaagacgg taccggctcg 1010
caggacgaaac tggacgtgg tgaaggatcg cagttcgacc gtggctacct gtctccctac 1020
ttcatcaaca agccggaaac tggcgccagta gaactggaaa gcccggttcat cctgctggct 1110
gacaagaaaaa tctccaacat ccgcgaaatcg ctggccggtc tggaaagctgt tgccaaagca 1220
ggcaaacccjc tgctgatcat cgctgaagat gtggaaaggcg aaggcgctggc aactctggc 1330
gttaaaccacca tgcgtggcat cgtgaaagtc gotgggtta aaggcacggg cttcggcgat 1320
cgtcgaaaag ctatgctyca ggatatcgca accctgactcg gcggttaccgt gatctctgaa 1380
gagatcggtt tggagctgg aaaaagcaacc ctggaaagacd tgggtcaggc taaaacgtgt 1440
gtgatcaaca aagacaccac caatcatc gatggcgttg gtggaaagc tgcaatccag 1500
ggccgtgttg ctcagatccg tcagcgatt gaagaajcaa ctgttgcata cgaccgtgaa 1540
aaactgcagg aacgcgttagc gaaactggca ggccggcgtt cagttatcaa agtgggtgt 1610
gctaccgaag ttgaaatgaa agagaaaaaa gcacgcgttg aagatgccct gcacgcgacc 1630
cgtgctgccc tagaagaagg cgtgggtgt gttgggtgt ttgcgttgat ccgcgttagcg 1740
tctaaactgg ctgacactgcg tggtcagaac gaagaccaga acgtgggtat ccaaagttgca 1800
ctgcgtgcaa tggaaagctcc gtcgtcgat atcgatattcg aatgcggcgaa agaaccgtct 1960
gttgttgcata acacccgttac aaggcgccgac ggcaactacg gttacaacgcg agcaaccgaa 1910
gaataccggca acatgatcgat catgggtatc ctggatcgaa ccaaagtaac tcgttctgt 1930
ctgcagtacg caqcttcgtt ggttggcctg atgatccca cggaaatgcgtt gtttaccgac 2040
ctggccggaaa acqatgcgcg tggacttaggc gttgttggcg gttatggcgcat gatgggttgc 2110
atggggccgaa tggatgttatt gggcgatcgacc tggcggaaat aaacaaaccc cccggg 2155

```

〈210〉 14

<11> 3139

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 14

agcttatgaa gttctgaccg actcgaaaaa acgtgcggca tacgatcagt atggtcatgc 2220
 tgcgtttgag caagggtggca tggggggcgg cggtttggc ggcggccgac acttcagcga 2220
 ttttttgtt gacgttttgg cgatatttt tggcgccggaa cgtggtcgtc aacgtgcggc 2340
 ggcgggtgtt gattacgtt ataacatggaa gtcaccctc gaagaagctg tacgtggcgt 2400
 gaccaaaagag atccgcattt cgactctggaa agagtgtgac gtttgcacg gtagcgggtc 2460
 aaaccaggta acacagccgc agacttgc gacctgtcat gtttctggc aggtgcagat 2520
 ggcggcaggaa ttcttcgtt tacagcagac ctgtccacac tgcaggggcc gcggtacgt 2580
 gatcaaagat ccgtcaaca aatgtcatgg tcatggcgt gttgagcga gcaaaacgt 2640
 gtccgttaaa atcccgccag gggtgacac tggagaccgc atccgtttt cgggcgaagg 2700
 tjaagegggc gagcatggcg caccggcagg cgatctgtac gttcagggtt aggttaaaca 2760
 gcaccccgatt ttccgacgtt aaggcaacaa cctgtatttc gaagtcggca tcaacttcgc 2820
 tatggcggcg ctgggtggcg aaatcgaagt accgaccctt gatggtcgcg tcaaactgaa 2880
 aqgtgcctggc gaaacccaga ccggtaagct attccgtatg cgccgtaaag gcgtaagtc 2940
 tgcccgccgt ggcgcacagg gtgatttgc gtcggcgcgtt gtcgtggaaa caccggtagg 3000
 cttgaacgaa aggcaaaaaac agctgtgca agagctgcaaa gaaagcttcg gtggcccaac 3060
 cggcgagcac aacagccccgc gtcCAAAGAG cttctttgtt ggtgtgaaga agtttttga 3120
 cggacctgacc cgctaataa 3139

<210> 15

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 15

cccccccccggg atgggtaaaa taattggtat cgac

34

<210> 16

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 16

cgcgggatcc ttattagcgg gtcaggtcgt caaaaaaa

37

<210> 17

<211> 594

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 17

 atgagtagta aagaacaqaa aacgcctgag gggcaagccc cggaaagaaat tatcatggat 60
 gagcaccggaa agattggggc agttgagccaa gaaaccttctt ctggcgggtt ggatccccgc 120
 gatgaaaaag ttgcgaatctt cgaagctcag ctggctqaag cccagacccg tgaacgtgac 180
 cgcattttgc gtgtaaaaggc cggaaatggaa aacctgcgtc gtcgtactga actggatatt 240
 gaaaaagccc acaaatttgc gtcggagaaa ttcattcaacg aatttgcgtcc ggtgatttgc 300
 aacgcctgatc gtgcgttgc agtggctgtt aaagctaaacc cggatattgtc tgcgtatgtt 360
 gaaaggcatttgc agtgcacgtt gaaatgcgtt ctggatgttgc tgcgtaaatgtt tggcgttggaa 420
 gtgatcgccg aaactaacgtt cccactggac cccaaatgttgc atcaggccat cgcacatgtt 480
 gatctgtatc acgttgcgcg aggttaacgtt ctggccatca tgcagaagggtt tataacgtt 540
 aatggtcgtt cgttccgtt ggcgtatgtt actgttagcga aagcaaaagc ttaa 594

<210> 18

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer
 <400> 18
 cgcqqaattc atgagtagta aagaacagaa aacg 34
 <210> 19
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer
 <400> 19
 aaaactgcag ttattaagct tttgctttcg ctacagt 37
 <210> 20
 <211> 2574
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

 <400> 20
 atgogtstgg atcgtcttac taataaattc cagttgctc ttgccatgc ccaatcactt 60
 gcactcgggc acgacaacca atttatcgaa ccacttatt taatgagcgt cctgctgaat 120
 caggaagggg gtcgggttag tccttatta acatccgtc gcataaatgc tggczagttg 180
 cgcacagata tcaatcaggc attaaatcgat ttaccgsagg ttgaaggtas tggtggtgtat 240
 gtccaggccat cacaggatct ggtgcgtt ctaatstt ggcacaagct ggcgcaaaaaa 300
 cgtggtgata actttatctc gtcagaactg ttcgttctgg cggcacttga gtctcgccgc 360
 acgctggccg acatcctgaa agcagcaggg ggcaccaccc ccaacattac tcaagcgtt 420
 gaacaatgc gttggaggtga aagcgtgaac gatcaaggtt ctgaagacca acgtcaggct 480
 ttgaaaaaat ataccatcga ctttaccgaa cgagccgaac agggcaaaact cgttccgggt 540
 attggtcgtg atgaagaaaat tggccgttac attcagggtgc tgcaacgtc tactaaaaat 600
 aaccgggtac tggatgttgc accccgggtc gtataaaactc ccatcgttgc aggtctggcg 660
 caggttatta tcaacggcgca agtgcggaa ggggttgsaaag gcccgggggtg actggcggtg 720
 gatatgggcg cgttgggtgc tggggcgaaa tatecggttgc agtttgcggaa acgtttaaaa 780
 jjcgtgttta acgatcttgc caaaacaggaa ggcaacgtca ttatattttat cgcacgaaat 840
 cttaccatgg tggggcgccgg taaaggccgt ggcgcatttgc aacccggggaa catgtgtaaa 900
 cggcgctgg cgcgtgggtgc atttgcattgc ttaggtgcgc cgcacgttgc cgaatattgc 960
 cgtacatttgc aaaaagatgc tgcgttggaa cgtcggttgc agaaagtgtt tttgcggag 1020
 cttttgttgc aagataccat tgcgatttgc cgtggcggttgc aagaaacgtt cgaatttgcac 1080
 caccatgtgc aaattactga cccggcaattt gttgcggccgg cgcacgttgc tcatgttgcac 1140
 attgtgttgc gtcgtgtgc ggataaaagcc atcgacatgc tgcgttgc gcatccggc 1200
 attgtgtatgc agattgtactc aaaaccggaa gaactcgacc gactcgatgc tcgtatcattc 1260
 cagtcggaaac tggaaacaaca gggttgcgttgc aaagagtcgt atgaagccag taaaaaaatgt 1320
 tggatatgc tcaacggaaatc atttgcgttgc aaaaacgttgc agtactccgtt gtttgcggaa 1380
 gagttggaaatc cggggggatgc atcgatgttgc ggtacgttgc cccatggaa gggaaatgttgc 1440
 cggggggaaaatc tggatgttgc cccatggaaatc tggatgttgc ggttgcgttgc gatgttgcgttgc 1500
 cggcaataccg gcaaaatccg ggttgcgttgc cccatggaaatc tggatgttgc gcatccggc 1560
 gggaaaatccg tggatgttgc ggttgcgttgc cccatggaaatc tggatgttgc gcatccggc 1620
 gggatgttgc cggggatgc ggttgcgttgc atcgatgttgc ggcggccgttgc aaaaacgttgc 1680
 cgtatgttgc aagaatgttgc cccatggaaatc tggatgttgc acggatgttgc tggatgttgc 1740
 ttcgttgcgttgc ttcgttgcgttgc cccatggaaatc tggatgttgc gcatccggc 1800
 ttctgttgc tccggccaaatc tggatgttgc ggttgcgttgc aaaaacgttgc tttgttgcgttgc 1860
 ttatgtttgc atagcgacgc ggcgttgcgttgc cgtatgttgc tggatgttgc gcatccggc 1920
 cactcggtgt ctcgttgcgttgc tggatgttgc ggttgcgttgc cccatggaaatc tggatgttgc 1980
 tacatgttgc aagggttgcgttgc tggatgttgc ggttgcgttgc cccatggaaatc tggatgttgc 2040
 aagcgccatc cggatgttgcgttgc cccatggaaatc tggatgttgc gcatccggc 2100
 gacggggcaag ggagaacgttgc cccatggaaatc tggatgttgc gcatccggc 2160
 ggttccgttgc tggatgttgc ggttgcgttgc cccatggaaatc tggatgttgc gcatccggc 2220
 gttgttgcgttgc tggatgttgc ggttgcgttgc cccatggaaatc tggatgttgc gcatccggc 2280
 gttgttgcgttgc atcgatgttgc tggatgttgc ggttgcgttgc cccatggaaatc tggatgttgc 2340
 cgtctgtaca aacgttgcgttgc tggatgttgc ggttgcgttgc cccatggaaatc tggatgttgc 2400

aaactgctga gcgagaacgg ttacgatccg gtctatggtg cacgtcctct gaaacgtgca 2460
attcagcagc agatcgaaaa cccgctggca cagcaaatac tgtctggta attggttccg 2520
ggtaaagtga ttccgcctgga agttaatgaa gaccggattt tcgcccgtcca gtaa 2574

<210> 21
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 21
aaaactgcag atgcgtctgg atcgtcttac taat 34

<210> 22
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 22
ccccggaaaggc ttattactgg acggcgacaa tccggtc 37

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer aktiven heterodimeren AMV-RT in prokaryotischen Wirtszellen, dadurch gekennzeichnet, daß,
 - (i) eine oder mehrere DNA-Sequenz(en), die für die α- und/oder β-Kette der AMV-RT kodieren, in Expressionsplasmide kloniert werden,
 - (ii) die Expressionsplasmide in prokaryotische Zellen transformiert werden,
 - (iii) die lösliche Expression der heterodimeren AMV-RT induziert wird und
 - (iv) die rekombinante heterodimere AMV-RT aus den Zellen isoliert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die für die α- und β-Kette kodierenden DNA-Sequenzen auf getrennten Expressionsplasmiden kloniert in einer Zelle exprimiert werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die für α- und β-Kette kodierenden DNA-Sequenzen auf einem Expressionsplasmid kloniert in einer Zelle exprimiert werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sowohl die α- als auch die β-Kette mit einer Peptidsequenz fusioniert ist.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die α- oder β-Kette mit einer Peptidsequenz bestehend aus 2 bis 10 Argininresten und die β- oder α-Kette mit einer Peptidsequenz bestehend aus 2 bis 10 Histidinresten fusioniert sind.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die für die α- und β-Kette kodierenden DNA-Sequenzen, die mit für zur reversiblen Bindung befähigte Peptidsequenzen kodierenden DNA-Sequenzen verbunden sind, auf einem Expressionsplasmid kloniert in einer Zelle exprimiert werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß α- und β-Kette mit der gleichen zur reversiblen Bindung befähigten Peptidsequenzen fusioniert sind.

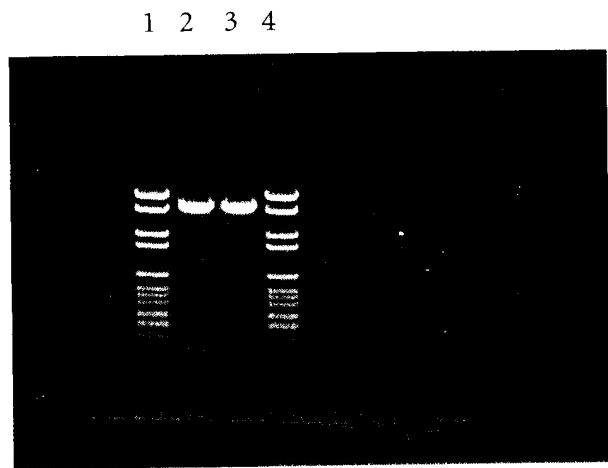
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß α - und β -Kette jeweils mit einer Peptidsequenz bestehend aus 2 bis 10 Histidinresten fusioniert sind.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression bei einer Wachstumstemperatur von 10° bis 25°C und einer erniedrigten Induktorkonzentration erfolgt.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression durch Coexpression von Hilfsgenen gesteigert wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß als Hilfsgen das *trpT*-Gen, das für die Tryptophan-tRNA kodiert, verwendet wird.
12. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression durch Coexpression von Chaperongenen erhöht wird.
13. Verfahren nach Anspruch 10 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Gene für GroEL und GroES, Dnak und DnaJ, GrpE und/oder ClpB coexprimiert werden.
14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Gene für GroEL und GroES auf dem Expressionsplasmid, das auch die Gene für die α - und die β -Kette trägt, kloniert sind und die Gene für Dnak, DnaJ, GrpE und ClpB auf einem Helperplasmid kloniert sind .
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß zur Isolierung bzw. Aufreinigung der rekombinanten heterodimeren AMV-RT geeignete Affinitätschromatographiematerialien verwendet werden.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die zur Aufreinigung verwendeten Affinitätschromatographiematerialien die unterschiedlichen, an die α - und/oder β -Kette gebundenen Peptidsequenzen, reversibel gebunden.
17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß die zur Aufreinigung verwendeten Affinitätschromatographiematerialien metallionenchelatisierende Materialien oder Kationenaustauscher sind.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Sequenz SEQ ID NO: 5 oder die DNA-Sequenzen SEQ ID NO: 4 und SEQ ID NO: 5 in einer prokaryotischen Wirtszelle exprimiert werden.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß *E. coli* als Wirtszelle verwendet wird.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die aktive heterodimere AMV-RT aus den Untereinheiten SEQ ID NO: 6 und SEQ ID NO: 7 besteht.
21. Verwendung einer nach dem Verfahren der Ansprüche 1 bis 20 erhältlichen AMV-RT zur Amplifikation von RNA-Sequenzen

Zusammenfassung:

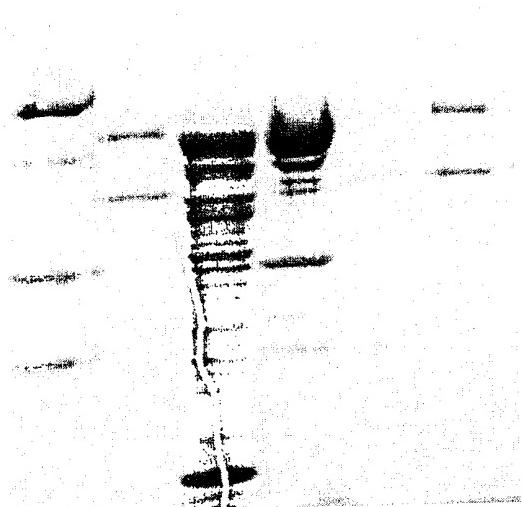
In der vorliegenden Erfindung wird die heterologe Expression der Reversen Transkriptase aus dem *Avian Myeloblastosis Virus* (AMV-RT) in prokaryotischen Zellen, insbesondere *Escherichia coli* (*E. coli*) beschrieben. Die Erfindung beinhaltet ebenfalls bestimmte Maßnahmen zur vereinfachten Aufreinigung der heterodimeren AMV-RT.

Figur 1



Figur 2

1 2 3 4 5 6



Figur 3

